



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y
TECNOLOGÍA AVANZADA
DEPARTAMENTO DE NANOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE BIO-HIDROXIAPATITA DE PORCINO OBTENIDA MEDIANTE INCINERACIÓN CONTROLADA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN TECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

RODRIGO JERÓNIMO CRUZ



DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Mario Enrique Rodríguez García
M. en C. Sandra Milena Londoño Restrepo

JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO.

AGOSTO, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Copyright © 2018 por Rodrigo Jerónimo Cruz.

Todos los derechos reservados.

Dedicatoria

La presente Tesis se la dedico a mi familia que son la razón de todos mis logros y que creen en mí ciegamente apoyándome en todo nuevo reto que me propongo.

A mi madre Inés Cruz Aguilar por todo el cariño y apoyo que me da de manera incondicional.

A mi padre José Sixto Jerónimo Sánchez por ser un ejemplo a seguir y ser fuente de mi constante esfuerzo.

A mi hermano Rogelio Jerónimo Cruz por compartir sus conocimientos y todas esas pláticas enriquecedoras que tenemos.

Por último y no menos importante, a mi hermano mayor Rene Jerónimo Cruz, por todo el apoyo que le das a nuestra familia sin esperar nada a cambio.

Agradecimientos

Al programa UNAM-PAPIIT IN112317, que fue el que financió la investigación realizada para la elaboración de la presente Tesis.

Al programa de ayudante de Investigador del Sistema Nacional de Investigadores nivel III del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con EXP. AYTE. 13662, por los recursos que me brindaron y estimularon a lo largo de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi hogar de estudio desde hace más de 7 años, en la preparatoria E.N.P. 3 “Justo Sierra” y en la licenciatura en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada.

Al TCJ 2012 del Centro de Geociencias, proyecto PAPIME PE100912 UNAM Campus Juriquilla, por permitirme acercarme a la ciencia y conocer la licenciatura en Tecnología.

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez García, a la M. en C. Sandra Milena Londoño Restrepo y al M. en C. Cristian Felipe Ramírez Gutiérrez, personas que considero mis tutores y parte fundamental de mi formación académica para la realización de esta tesis, gracias por compartir conmigo sus conocimientos, por todos los consejos y su ayuda a lo largo de este tiempo.

A la M. en I.Q. Alicia del Real López por los servicios brindados en el Laboratorio de Microscopía en el CFATA, y por la asesoría dada en la revisión de la tesis como miembro del jurado.

A la Dra. Beatriz M. Millán Malo por los servicios brindados en el Laboratorio de Difracción de Rayos X en el CFATA, y por la asesoría dada en la revisión de la tesis como miembro del jurado.

Al Dr. Eric M. Rivera Muñoz, el Dr. Pedro Salas Castillo y a la Dra. Cristy Leonor Azanza Ricardo por ser miembros de mi jurado y por todo el apoyo y las críticas constructivas.

Al Dr. Ángel R. Hernández Martínez por la asesoría dada para los análisis de TGA/DSC.

Agradecimientos personales

Al Dr. Juan Martín Gómez González y a la M. en C. Carolina Muñoz Torres por enseñarme lo importante de la divulgación de la Ciencia.

A Daniel Ayala Román por ser mi amigo y compañero de trabajo a lo largo de los 8 semestres de la licenciatura, a pesar de todos los momentos difíciles, el compañerismo que tuvimos fue de gran ayuda para superar todos los obstáculos que se nos presentaron.

A mis amigas Itzel Enríquez, Ilse Barrera y Grecia González que, aunque estén lejos, siempre estuvieron para mí llenándome de consejos y brindándome su invaluable amistad.

A mis amigas Erika Olivares y Xóchitl Tapia por todos esos momentos de apoyo que me dieron dándome toda su confianza.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, que más que ser amigos era como una segunda familia colombiana y mexicana.

Y por último, a todos mis compañeros y amigos de generación, por todos estos años de convivencia.

Contenido

Introducción	1
1.1 Hidroxiapatita	1
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis	4
1.4 Objetivos generales	4
1.5 Objetivos específicos	5
Marco Teórico.....	6
2.1 Tejido óseo.....	6
2.2 Estructura fisicoquímica de la hidroxiapatita	8
2.3 La hidroxiapatita en el cuerpo humano.....	9
2.4 Importancia de la hidroxiapatita	10
2.5 Tipo de hidroxiapatita según su origen.....	11
2.6 Técnica de caracterización.....	12
2.6.1 Análisis gravimétrico térmico (TGA).....	12
2.6.2 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	15
2.6.3 Espectroscopia infrarroja (IR).....	16
2.6.4 Difracción de rayos X (DRX).....	19
2.6.5 Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción	22
2.6.6 Microscopia electrónica de barrido.....	24

Metodología	26
3.1 Obtención de polvo de hueso de porcino	26
3.1.1 Limpieza primaria.....	27
3.1.2 Molienda y tamizado.....	27
3.1.3 Tratamiento Hidrotérmico	28
3.2 Obtención de bio-Hap por el método de incineración	29
3.3 Caracterización Fisicoquímica.....	31
3.3.1 Análisis térmico por TGA/DSC.....	31
3.3.2 Análisis por espectroscopía IR.....	32
3.3.3 Análisis cristalográfico por DRX.....	33
3.3.4 Análisis composicional por ICP-OES.....	34
3.3.5 Análisis morfológico por SEM.....	35
Resultados y Discusión	36
4.1 Caracterización Fisicoquímica.....	36
4.2 Muestras obtenidas de bio-Hap.....	39
4.3 Espectroscopía IR	41
4.4 Identificación de fases cristalinas por DRX.....	45
4.5 Caracterización composicional por ICP-OES.....	52
4.6 Microestructura Superficial por SEM.....	55
Conclusiones	60
Referencias.....	62
Apéndice	66
• Patrones de difracción de las muestras de la Fase I.....	66
• Patrones de difracción de las muestras de la Fase II.....	70

Lista de figuras

Figura 1 Epífisis de un hueso largo de adulto.....	7
Figura 2 Representación cristalográfica de la Hap estequiométrica.....	9
Figura 3 Representación gráfica de los resultados obtenidos por TGA y DTG.	13
Figura 4 Diagrama de las partes básicas de una termobalanza TGA.....	14
Figura 5 Curva típica de DSC.....	15
Figura 6 Esquema de un interferómetro de Michelson.....	17
Figura 7 Espectro IR característico de 2-hexanona	18
Figura 8 Diagrama de la difracción de un haz en un material cristalino, Ley de Bragg...	19
Figura 9 Patrón de difracción de rayos X característica del NaCl.....	20
Figura 10 Diagrama general del funcionamiento de un equipo de ICP- OES.....	23
Figura 11 Esquema del microscopio electrónico de barrido (SEM).....	25
Figura 12 Diagrama de bloques para la obtención de bio-Hap.....	26
Figura 13 Limpieza primaria	27
Figura 14 Proceso de molienda.....	28
Figura 15 Autoclave usado para el tratamiento hidrotérmico.....	28
Figura 16 Fase I: Diseño experimental	29
Figura 17 Fase II: Diseño experimental.....	30
Figura 18 Equipo de TGA/DSC 2 STAR ^e System.	31
Figura 19 Espectrofotómetro IR Bruker Vector 33	32

Figura 20 Difractómetro Ultima IV-Rigaku.	33
Figura 21 Microondas Mars Xpress, Equipo ICP-OES Thermo iCAP 6500 Duo View..	34
Figura 22 Microscopio electrónico de barrido Hitachi SUB230	35
Figura 23 Resultados de los análisis térmicos.	37
Figura 24 Perfiles térmicos de la Fase 1.	39
Figura 25 Muestras obtenidas de la Fase I.....	40
Figura 26 Perfiles térmicos de la Fase II	40
Figura 27 Muestras obtenidas de la Fase II	41
Figura 28 Espectros IR de las muestras obtenidas de la Fase I	43
Figura 29 Espectros IR de las muestras obtenidas de la Fase II	44
Figura 30 Difractograma de la muestra HPTH	45
Figura 31 Difractograma de las muestras de la Fase I	46
Figura 32 Difractograma de las muestras de la Fase II.....	47
Figura 33 Difractograma de las muestras de la Fase II, de 620 a 720 °C.....	48
Figura 34 Difractograma de las muestras de la Fase II, de 740 a 820 °C.....	50
Figura 35 Calculo del FWHM del plano (0 0 2), muestras de la Fase II.....	50
Figura 36 Relación molar Ca/P	53
Figura 37 Composición química elemental	54
Figura 38 Micrografía de las muestras de la Fase I	56
Figura 39 Micrografía de las muestras de la Fase II	58

Figura 40 Micrografía de las muestras de la Fase II.....	59
Figura 41 Difractograma de bio-Hap a 500 °C por 12 horas a 5 °C/min	66
Figura 42 Difractograma de bio-Hap a 520 °C por 12 horas a 5 °C/min	67
Figura 43 Difractograma de bio-Hap a 540 °C por 12 horas a 5 °C/min	67
Figura 44 Difractograma de bio-Hap a 560 °C por 12 horas a 5 °C/min	68
Figura 45 Difractograma de bio-Hap a 580 °C por 12 horas a 5 °C/min	68
Figura 46 Difractograma de bio-Hap a 600 °C por 12 horas a 5 °C/min	69
Figura 47 Difractograma de bio-Hap a 620 °C por 3 horas a 5 °C/min	70
Figura 48 Difractograma de bio-Hap a 640 °C por 3 horas a 5 °C/min	70
Figura 49 Difractograma de bio-Hap a 660 °C por 3 horas a 5 °C/min	71
Figura 50 Difractograma de bio-Hap a 680 °C por 3 horas a 5 °C/min	71
Figura 51 Difractograma de bio-Hap a 700 °C por 3 horas a 5 °C/min	72
Figura 52 Difractograma de bio-Hap a 720 °C por 3 horas a 5 °C/min	72
Figura 53 Difractograma de bio-Hap a 740 °C por 3 horas a 5 °C/min	73
Figura 54 Difractograma de bio-Hap a 760 °C por 3 horas a 5 °C/min	73
Figura 55 Difractograma de bio-Hap a 780 °C por 3 horas a 5 °C/min	74
Figura 56 Difractograma de bio-Hap a 800 °C por 3 horas a 5 °C/min	74
Figura 57 Difractograma de bio-Hap a 820 °C por 3 horas a 5 °C/min	75

Lista de tablas

Tabla 1 Valores típicos de composición de la fase inorgánica de tejidos calcificados de adultos humanos [5].....	10
Tabla 2 Fenómenos físicos y químicos proporcionados por el TGA, de acuerdo con la naturaleza del material.	12
Tabla 3 Valores del espectro FTIR de HPT y de las muestras incineradas a diferentes condiciones determinados en el diseño experimental de la Fase I y la Fase II.....	42
Tabla 4 Composición química elemental del polvo de hueso de porcino (HP), polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico (HPTH), y bio-Hap obtenido a 600, 700 y 800 °C	52

¡Actúa en vez de suplicar! ¡Sacrificate sin esperanza de gloria ni recompensa! Si quieres conocer los milagros, hazlos tú antes. Sólo así podrá cumplirse tu peculiar destino.

Ludwig van Beethoven

INTRODUCCIÓN

1.1 Hidroxiapatita

La Hidroxiapatita (Hap) es un material que pertenece al grupo de los apatito-(CaOH) con fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [1], tiene una relación molar estequiométrica Ca/P de 1.67 y posee una estructura cristalográfica de forma hexagonal del grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$ y parámetro de red de $a=b=9.42\text{\AA}$, y $c=6.88\text{\AA}$ [2]. Este material también se encuentra en su forma natural en los huesos en el esqueleto de los vertebrados, en la dentina y el esmalte dental, siendo el principal componente de la fase inorgánica.

En las últimas décadas el estudio de la Hap ha tomado importancia debido a sus características fisicoquímicas, así como la similitud estructural y química que tiene con el tejido óseo humano. Estas características lo hacen un material idóneo para diversas aplicaciones tales como biomedicina, cromatografías de proteínas, fertilizantes, productos farmacéuticos y tratamiento de agua. En el área biomédica la Hap, ya sea de origen natural o sintético, es ampliamente utilizada en implantes como sustituto óseo o revestimiento de prótesis metálicas, debido a sus cualidades de bioactividad, biocompatibilidad, estabilidad, no toxicidad y osteoconducción [3].

La Hap se puede clasificar como sintética o natural, de acuerdo con la fuente de obtención [4]. La Hap sintética es obtenida generalmente a partir de fosfatos dicálcicos y tricálcicos a través de un proceso de síntesis, obteniendo un material que presenta propiedades estequiométricas, con una relación molar de Ca/P de 1.67, sin embargo, presenta una baja porosidad y resistencia mecánica y alta solubilidad [1]. Por otro lado, la Hap natural (también llamada bio-Hap) es obtenida a partir de huesos de animales o humanos mediante métodos térmicos como la incineración. La bio-Hap no es estequiométrica, pues contiene trazas de otros elementos sustitucionales tales como Cl^- , F^- , K^+ , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} , teniendo una relación molar de Ca/P diferente a 1.67, siendo esto lo que le confiere una mayor biocompatibilidad ya que lo hace un material de mayor semejanza al tejido óseo humano, en su forma estructural y química, a diferencia de la Hap sintética [5], [6].

El tamaño de partícula y la morfología de la Hap son dos factores importantes que influyen en las propiedades del material para el uso de aplicaciones biomédicas [7], [8]. En la obtención de Hap sintética, para el control de la morfología y tamaño de los cristales, se hace uso de metodologías relativamente complicadas a diferencia de las utilizadas en la obtención de bio-Hap.

En el caso de la Hap natural, utilizando el método de incineración, se han reportado cambios morfológicos del material asociado a los parámetros térmicos tales como la velocidad de calentamiento, la temperatura final de incineración, medio y tiempo de sinterización o velocidad de enfriamiento. No obstante, no se ha esclarecido en la literatura la dependencia de las características fisicoquímicas con respecto a los parámetros térmicos ya mencionados, es por ello que el propósito de la presente tesis es correlacionar las propiedades fisicoquímicas dadas por las condiciones térmicas en el método de incineración en un rango de temperatura de 500 a 820 °C, considerando que a temperaturas mayores a 500 °C se lleva a cabo la combustión completa de la fase orgánica y a temperaturas menores a 820 °C se busca evitar la formación de otras fases cristalinas [9].

El correlacionar las propiedades fisicoquímicas de la bio-Hap en función a las condiciones térmicas establecidas en el método de incineración permite establecer metodologías para la obtención de bio-Hap con características determinadas que estén estrechamente ligadas con las posibles aplicaciones del material.

1.2 Justificación

La bio-Hap es en la actualidad un excelente material para revestimiento de prótesis metálicas o sustituto óseo gracias a su alta biocompatibilidad con el tejido circundante debido a que presenta una serie de trazas de elementos sustitucionales que lo hace semejante al tejido óseo [6], en comparación con su contraparte sintética que es un material estequiométrico el cual tiene baja porosidad y menor biocompatibilidad. A pesar de ello, este material es utilizado en otras áreas como material adsorbente, en catálisis, sensores y cromatografías [10].

Lo anteriormente mencionado conllevó a que la Hap sea ampliamente estudiada en las últimas décadas. No obstante, a pesar de ser un material bastante utilizado en el área de la biomedicina, las hidroxiapatitas comerciales siguen teniendo precios elevados para la mayoría de la población, lo cual implica que la obtención de bio-Hap a partir de fuentes naturales, tales como huesos de animales, resulte atractiva ya que es un material de bajo costo que se procesa para extracción de gretina u otros productos, o en su defecto, sea considerado como desecho.

La aplicación que se le da a este material se encuentra generalmente relacionada con su tamaño de partícula y su morfología, en el caso de la obtención de bio-Hap usando el método de incineración, en la literatura se ha reportado que estas propiedades están directamente relacionadas con los parámetros térmicos establecidos durante el proceso de incineración [3], [11], [12], sin embargo, aún no se ha esclarecido la dependencia entre las mismas, siendo esto el propósito de la presente tesis. El entender la relación entre las condiciones de incineración y las cualidades obtenidas del material, posteriormente nos permitiría proponer metodologías para la obtención de bio-Hap con características orientadas a sus posibles aplicaciones.

1.3 Hipótesis

Estudios preliminares por TGA/DSC de polvo de hueso de porcino pretratado permiten observar eventos térmicos que aún no han sido atribuidos a transformaciones conocidas en la literatura y, debido a que tales transformaciones suceden en rangos de temperatura donde ya no hay presencia de compuestos orgánicos (500 a 840 °C), se puede decir que son debidas a cambios estructurales.

1.4 Objetivos generales

- ✚ Fase I: Obtener y caracterizar fisicoquímicamente bio-hidroxiapatita derivada de hueso cortical de porcino pretratado por incineración controlada en el rango de temperatura de 500 a 600 °C con muestreo cada 20 °C, que corresponde a la Fase I del experimento, con el propósito de estudiar la pérdida de materia orgánica y la microestructura de la bio-hidroxiapatita mediante análisis de difracción de rayos-X, análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido (TGA/DSC), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .

- ✚ Fase II: Obtener y caracterizar fisicoquímicamente bio-hidroxiapatita derivada de hueso cortical de porcino pretratado por incineración controlada en el rango de temperatura de 620 a 820 °C con muestreo cada 20 °C, que corresponde a la Fase II, con el propósito de identificar los cambios estructurales ocurridos mediante análisis de difracción de rayos-X, análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido (TGA/DSC), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .

1.5 Objetivos específicos

- ❖ Identificar los eventos térmicos ocurridos al polvo de hueso de porcino pretratado al ser sometido a una rampa de calentamiento mediante TGA/DSC de 25 a 1100 °C con una velocidad de 5 °C/min, para identificar rangos de temperatura de interés de estudio para la elaboración del diseño experimental.
- ❖ Obtener bio-Hap a partir de polvo de hueso de fémur de porcino pretratado mediante incineración controlada a temperaturas que corresponde las regiones de estudio de 500 a 600 °C y de 620 a 820 °C con muestreo cada 20 °C, que corresponde al diseño experimental de la Fase I y II respectivamente, para su posterior estudio fisicoquímico.
- ❖ Controlar la remoción de la fase orgánica de las muestras obtenidas en la Fase I y II mediante espectroscopia FTIR en configuración por ATR,
- ❖ Analizar el efecto de la temperatura de incineración en las propiedades estructurales de la bio-Hap mediante difracción de rayos X de las muestras de bio-Hap incineradas en la Fase I y la Fase II.
- ❖ Determinar la composición química por ICP del polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico, y de las muestras incineradas en 600, 700 y 800 °C para comprobar la composición característica de la bio-Hap.
- ❖ Determinar los cambios morfológicos en la bio-Hap como consecuencia del proceso de incineración controlada de las muestras obtenidas en la Fase I y Fase II mediante microscopia electrónica de barrido.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Tejido óseo

El tejido óseo se caracteriza por ser un tejido muy duro capaz de proporcionar sostén y protección a los tejidos circundantes; de igual manera se encarga de la regulación homeostática de los niveles de calcio en la sangre ya que sirve como sitio de almacenamiento de calcio y fosfato.

El tejido óseo se diferencia de otros tejidos conjuntivos por la mineralización de su matriz mediante la formación de cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ a partir de minerales de fosfato de calcio. En cuanto a la fase orgánica del tejido óseo, alrededor del 90% del peso total de las proteínas, está constituida por colágeno tipo I y, en menor proporción, el colágeno tipo V [13].

El 10% de peso total de proteínas restante es de otras proteínas no colágenas, esenciales para el desarrollo, el remodelado y la reparación ósea. Los cuatro grupos principales de proteínas no colágenas son [13]:

- Macromoléculas de proteoglicanos. Contribuyen a la resistencia a la compresión del hueso. También se encargan de la fijación de los factores de crecimiento y pueden inhibir la mineralización.
- Glucoproteínas multiadhesivas. Intervienen en la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas a la sustancia fundamental.
- Proteínas dependientes de vitamina K osteoespecíficas, incluida la osteocalcina. Encargadas de capturar el calcio de la circulación, así como atraer y remodelar los osteosclatos en el remodelado óseo.
- Factores de crecimiento y citocinas. Son pequeñas proteínas reguladoras.

El tejido óseo es el principal componente estructural de los huesos, parte primordial del sistema esquelético. Dentro de los huesos, el tejido óseo se puede clasificar en compacto (denso o cortical) y esponjoso (trabecular), como se observa en la Figura 1.

El hueso compacto se observa como una capa densa que forma la superficie ósea externa, mientras el esponjoso como una malla de aspecto esponjoso que está compuesta por delgadas espículas del tejido óseo formando la parte interior del hueso [14].

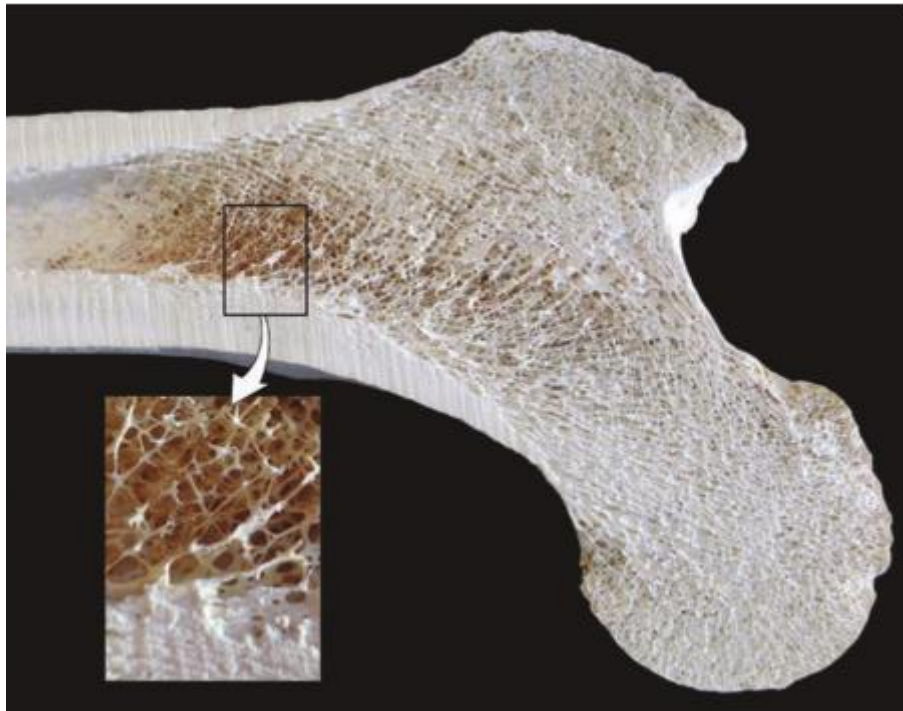


Figura 1 Epífisis de un hueso largo de adulto. El interior del hueso presenta una configuración esponjosa y representa el hueso esponjoso (trabecular). La porción externa del hueso tiene una estructura sólida y representa un hueso compacto (denso) [13].

El sistema esquelético de un humano adulto en promedio está conformado por 206 huesos, que son divididos en dos regiones:

- Esqueleto axial. Huesos de la cabeza y el tronco
- Esqueleto apendicular. Hueso de las extremidades y los de las cinturas (escapular y pélvica).

Dentro del sistema esquelético, los huesos a su vez se clasifican según su forma, que pueden ser:

- Huesos largos. Tienen una longitud mayor que las otras de sus dos dimensiones, por ejemplo, la tibia y los metacarpianos.
- Huesos cortos. Sus tres dimensiones son casi iguales, por ejemplo, los huesos carpianos de la mano.
- Huesos planos. Son delgados, por ejemplo, los huesos calvarios y el esternón.
- Huesos irregulares. Posee una forma que no permite clasificarlo dentro de las tres categorías anteriores, por ejemplo, las vértebras.

2.2 Estructura fisicoquímica de la hidroxiapatita

Las apatitas de fosfato de calcio tienen como fórmula química general $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$, donde X es un elemento electronegativo (un halógeno o un grupo hidroxilo). Entre estos grupos de compuestos se encuentra la hidroxiapatita (Hap $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ [15]). Tiene una relación molar estequiométrica de Ca/P de 1.67 y posee una estructura cristalográfica de forma hexagonal del grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$ y parámetro de red de $a=b=9.42\text{Å}$, y $c=6.88\text{Å}$, donde $\text{P6}_3/\text{m}$, se refiere a un grupo espacial con un eje de simetría “c” con seis ejes perpendiculares a tres ejes equivalentes (a_1 a_2 a_3) en los ángulos 120° [2].

La celda unidad más simple para la representación cristalográfica de la Hap consiste en el entrelazamiento de Ca, PO_4 y grupos OH visto desde el plano (0 0 1). Como se observa en la Figura 2a), los bordes de la celda unidad están delimitados por átomos de calcio columnar (Ca I), y en el interior se encuentra un grupo OH rodeado por seis átomos de Ca II que forma un par de triángulos superpuestos situados en paralelo al plano basal en $z=1/4$ y $z=3/4$, y con un ángulo de 60° de uno con respecto del otro (Figura 2b). Entre los átomos de calcio se encuentran 6 tetraedros fosfóricos distribuidos de tal manera en la cual tres de ellos se encuentran en el plano triangular del Ca II $z=1/4$ y los otros tres en el plano triangular del Ca II en $z=3/4$ [8], [16].

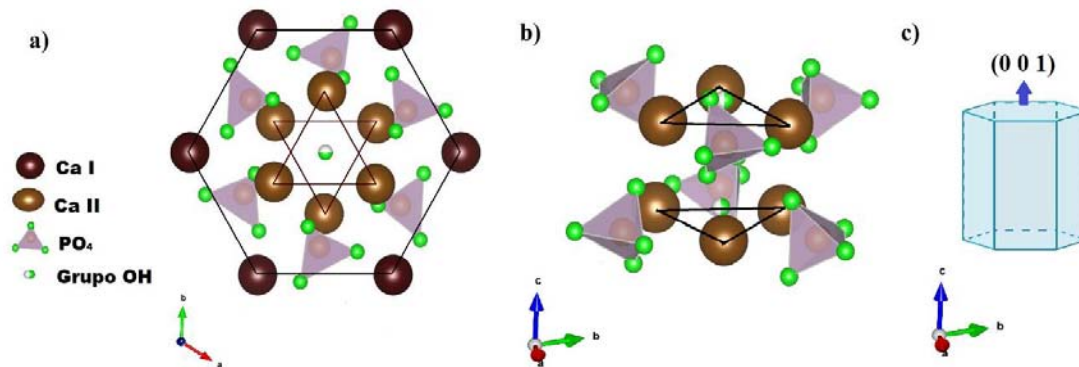


Figura 2 Representación cristalográfica de la Hap estequiométrica. a) Vista desde el plano (0 0 1), los bordes están delimitados por átomos de Ca I columnar y en el interior se encuentra un grupo OH rodeado por seis átomos de Ca II y seis tetraedros PO_4 . b) Los Ca II formar un par de triángulos superpuestos situados en paralelos al plano basal en $z=1/4$ y $z=3/4$, donde tres tetraedros PO_4 se encuentra en el plano triangular del Ca II $z=1/4$ y los otros tres en el plano triangular del Ca II en $z=3/4$. c) Crecimiento preferencial de la Hap en el eje "c" o en el plano (0 0 1) con morfología de un prisma hexagonal.

2.3 La hidroxiapatita en el cuerpo humano.

Como es bien sabido, el principal constituyente inorgánico del tejido óseo en los vertebrados es la hidroxiapatita (Hap) en forma de nanocristales, originados por la biomineralización en condiciones ambientales de presión y temperatura, en los huesos, dientes y los tendones para dar a estos órganos dureza, estabilidad y función.

La comparación de la composición de los tejidos calcificados tales como el hueso, dentina y esmalte dental en el cuerpo de un adulto humano con la hidroxiapatita se encuentra en la Tabla 1. Se observa la presencia de trazas de otros elementos sustitucionales a diferentes masas porcentuales, esto a su vez provoca una relación molar de Ca/P no estequiométrica, pues algunos iones pueden ser fácilmente sustituido por otros, por ejemplo, los iones de calcio pueden ser remplazados por Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ y Fe^{2+} ; los iones de fosfato pueden ser remplazados por carbonato, cloruro y bromuro [5].

Tabla 1 Valores típicos de composición de la fase inorgánica de tejidos calcificados de adultos humanos [5].

Composición	Esmalte	Dentina	Hueso	Hidroxiapatita
Calcio [m%]	36.5	35.1	34.8	39.6
Fosforo [m%]	17.7	16.9	15.2	18.5
Ca/P (relación molar)	1.63	1.61	1.71	1.67
Sodio [m%]	0.5	0.6	0.9	-
Magnesio [m%]	0.44	1.23	0.72	-
Potasio [m%]	0.08	0.05	0.03	-
Carbonato [m%]	3.5	5.6	7.4	-
Fluoruro [m%]	0.01	0.06	0.03	-
Cloruro [m%]	0.3	0.01	0.13	-
Pirofosfato [m%]	0.022	0.1	0.07	-
Total, inorgánico [m%]	97	70	65	100
Total, orgánico [m%]	1.5	20	25	-
Agua [m%]	1.5	10	10	-

El crecimiento preferencial de la Hap es visto en el plano (0 0 1), debido a que es termodinámicamente favorecido, teniendo una morfología de un prisma hexagonal. Por ejemplo, se ha observado que durante el proceso de biomineralización en los dientes (dentina y esmalte), el crecimiento del cristal de la Hap se produce de forma global a lo largo del eje c, o, mejor dicho, en el plano (0 0 1) [17]. Sin embargo, esto puede ser diferente en comparación con otros tejidos calcificados, un ejemplo sería los huesos, donde su forma (largo, corto, plano o irregular) y el esfuerzo mecánico que recibe son factores que pueden determinar la forma del crecimiento del cristal de Hap.

2.4 Importancia de la hidroxiapatita

El estudio de la Hap en las últimas décadas ha tomado importancia debido a sus características fisicoquímicas, así como la similitud estructural y química que tiene con el tejido óseo, además de que, entre el grupo de los cristales de fosfato de calcio, la Hap es el derivado más estable en pH de 4-14 estando dentro del intervalo en el que se deshace y se forma el hueso humano [7], [14]. Estas características lo hacen un material idóneo para diversas aplicaciones tales como biomedicina, cromatografías de proteínas, fertilizantes, productos farmacéuticos y tratamiento de agua.

La Hap en el área de la biomedicina es ampliamente utilizada debido a sus cualidades de bioactividad, biocompatibilidad, osteoconducción, estabilidad y no toxicidad. Por ejemplo, se ha usado como relleno de sustituto óseo, teniendo el papel de implante y a su vez promoviendo la osteogénesis para la regeneración del tejido óseo. También ha sido usado como revestimiento en implantes metálicos y bioglasses, para mejorar su bioactividad permitiendo la formación de enlaces fuertes con el tejido circundante [17].

2.5 Tipo de hidroxiapatita según su origen.

La Hap se puede clasificar en sintética o natural, de acuerdo con el origen y método de obtención. La Hap sintética puede ser obtenida por diferentes métodos como precipitación, sol-gel, irradiación de microondas, hidrólisis, microemulsión, entre otros [18]. Por otro lado, la Hap natural o también llamada bio-Hap es obtenida a partir de fuentes naturales (coral, hueso humano o de animales), usando métodos térmicos y químicos con el fin de eliminar toda la materia orgánica para prevenir el contagio de enfermedades y reacciones inmunológicas defensivas en caso de ser usado como injerto [6].

Unas de las principales diferencias de la Hap sintética en comparación con la Hap natural, es que la primera es un compuesto estequiométrico (compuestos daltónidos), mientras que, la Hap natural no es estequiométrica (compuestos bertólidos) dado a que tiene presencia de trazas de otros iones sustitucionales tales como Cl^- , F^- , K^+ , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} . La presencia de trazas de otros elementos sustitucionales en la Hap natural, hace que tenga mayor semejanza al tejido óseo, a diferencia de la Hap sintética, además de que es un factor que facilita la osteointegración del material con el tejido circundante.

2.6 Técnica de caracterización

2.6.1 Análisis gravimétrico térmico (TGA)

El análisis gravimétrico térmico (TGA por sus siglas en inglés) o también conocido como análisis termogravimétrico, es un método de análisis térmico que consiste básicamente en medir las variaciones de masa de un sistema (elemento, compuesto o mezcla) en función del aumento de la temperatura en forma lineal.

La técnica puede proporcionar información del material relacionada a determinados fenómenos físicos y químicos (reflejado en la pérdida de masa) ocasionados por el aumento de la temperatura en forma lineal. Dichos fenómenos pueden ser los siguientes [19]:

Tabla 2 Fenómenos físicos y químicos proporcionados por el TGA, de acuerdo con la naturaleza del material.

Fenómenos Físicos	Fenómenos químicos
Vaporización	Quimisorción
Sublimación	Desolvatación (especialmente deshidratación)
Absorción	Descomposición
Adsorción	Degradación oxidativa
Desorción	Reacciones de estado sólido
	Las reacciones de gas sólido (por ejemplo, oxidación o reducción)

A pesar de la información arrojada, la técnica no proporciona información sobre las transiciones cristalinas, las fusiones y las reacciones de estado sólidos, pues son producidas sin cambio de peso [19].

De acuerdo con lo anterior, entre las aplicaciones más comunes en la caracterización de materiales mediante el uso de esta técnica, están [20]:

- 1 Caracterización de materiales mediante análisis de patrones característicos de descomposición.
- 2 Estudios de mecanismos de degradación y cinética de reacción.
- 3 Determinación de contenido orgánico en una muestra.
- 4 Determinación de materiales inorgánicos (por ejemplo, cenizas).

Los resultados obtenidos por esta técnica generalmente son presentados de las dos siguientes formas:

- CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA). Se gráfica la pérdida de masa (generalmente en forma porcentual) en función del aumento lineal de la temperatura programada (o tiempo), véase Figura 3.
- CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DIFERENCIAL (DTG). Se grafica la primera derivada de la masa respecto a la temperatura (o tiempo) en función del aumento lineal de la temperatura programada (o tiempo) véase Figura 3. Es una forma de representación que permite visualizar de manera más clara cualquier cambio en la tasa de pérdida de masa.

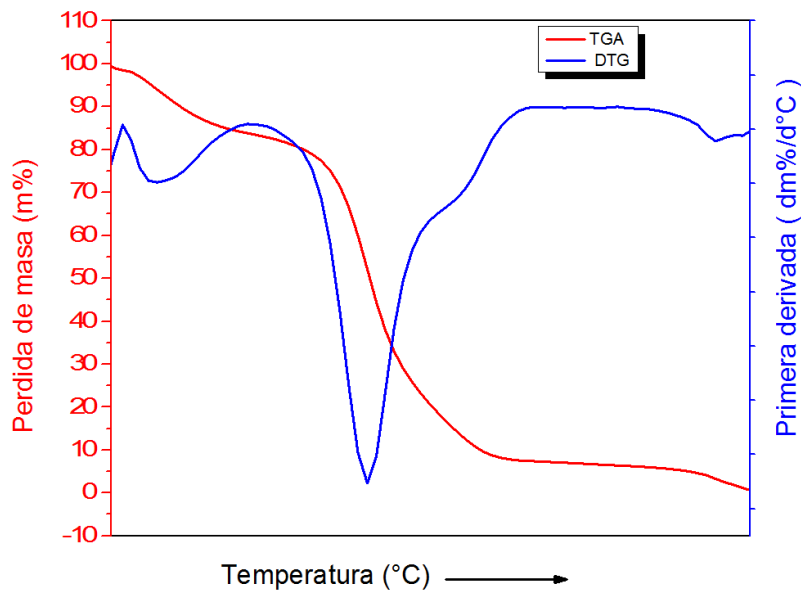


Figura 3 Representación gráfica de los resultados obtenidos por TGA y DTG.

Los resultados obtenidos por TGA pueden indicar la estabilidad térmica de un material. Cuando en un rango de temperatura no hay variación de masa, en la curva termogravimétrica se observa como una meseta; o la tasa de pérdida de masa, observada con una inclinación en la curva.

Por lo anterior, ésta técnica resulta útil para el estudio de materiales que son tratados a diferentes condiciones térmicas, en este caso, polvo de hueso de porcino incinerado a diferentes temperaturas.

El instrumento utilizado para realizar TGA se le llama termobalanza. Está conformado por varios componentes básicos que pueden proporcionar la flexibilidad necesaria para la realización del análisis con condiciones determinadas,

Los elementos básicos de la termobalanza son los siguientes (Figura 4):

1. Balanza y portamuestra.
2. Horno.
3. Sistema de control de rampa de temperatura programada.
4. Sensor de temperatura.
5. Sistema de control de atmósfera.
6. Balanza.
7. Unidad de registro automático de masa y temperatura

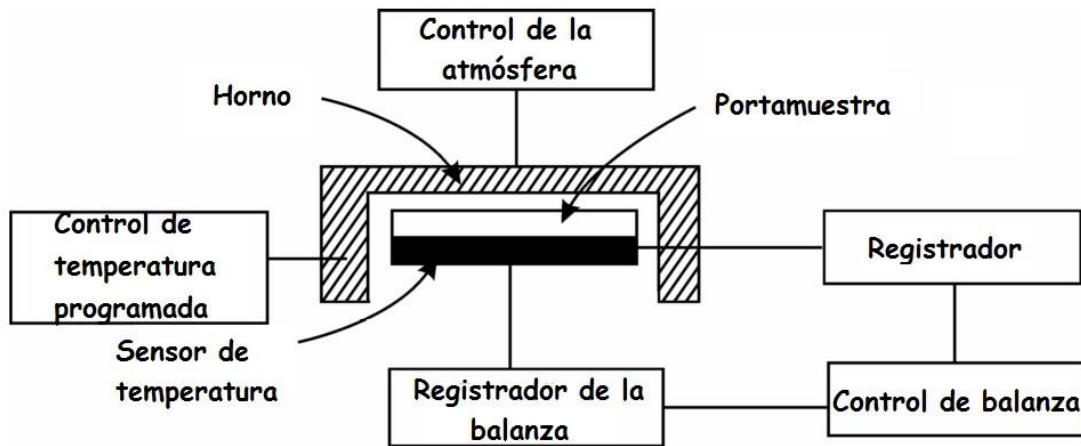


Figura 4 Diagrama de las partes básicas de una termobalanza TGA.

De acuerdo con el propósito del análisis, la naturaleza del material y la configuración del equipo, se pueden modificar parámetros de la prueba tales como velocidad de calentamiento, tipo de atmósfera (aire, nitrógeno, argón), tipo de portamuestra (dependiendo del tipo del material, o rango de temperatura de la prueba), entre otros [21].

2.6.2 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Otra técnica de caracterización térmica útil es la calorimetría de barrido diferencial (DSC por sus siglas en inglés). Este método mide los cambios de calor entre una muestra y una referencia mientras son sometidas a un programa de aumento de temperatura lineal controlada. A lo largo del experimento, tanto la muestra como la referencia son mantenidas a (casi) la misma temperatura [22]. En esta prueba, e igual que en el TGA, sólo se requieren unos cuantos mg de la muestra para realizar el análisis [23].

El DSC también detecta los cambios físicos o químicos sufridos por el material en relación con la temperatura del sistema programado. Estos cambios del material son seguidos por una ganancia o pérdida de calor (un proceso endotérmico o exotérmico), siendo observados por la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia [20], proporcionando así información cuantitativa de cualquier cambio de calor e identificando la temperatura en la que se producen estas transiciones [24], [25].

Un ejemplo de transición de fase observado por el DSC es cuando un material sólido se funde pasando a estado líquido, el sistema requerirá más calor fluyendo a la muestra (un proceso endotérmico) para aumentar su temperatura al mismo ritmo que la referencia. O en su caso contrario, cuando el material sufre un proceso de cristalización (proceso exotérmico), se requerirá menor calor para elevar la temperatura de la muestra [25].

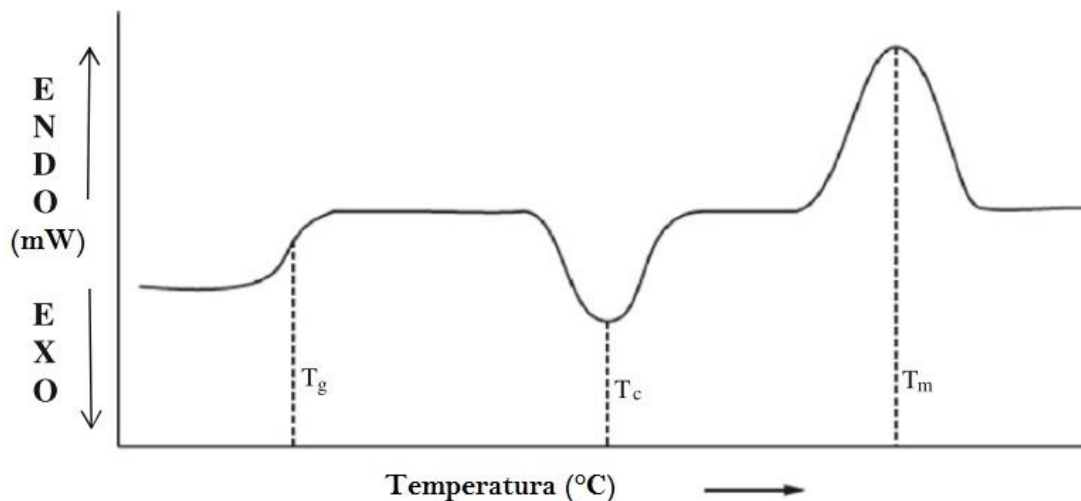


Figura 5 Curva típica de DSC, T_g - temperatura de transición vítrea, T_c - temperatura de cristalización, T_m - temperatura de fusión.

La representación de los resultados obtenidos por DSC, es una gráfica del flujo de calor en función de la temperatura donde cualquier transición ocurrida en el material es observada

como una discontinuidad en el flujo de calor (cambios de entalpía), indicándose hacia qué dirección se llevó a cabo un proceso exotérmico o endotérmico (véase la Figura 5). En otras representaciones, también se puede recurrir al uso de la primera o segunda derivada de las curvas calorimétricas para observar con mayor claridad los puntos en los cuales hay un cambio en la tasa calorimétrica.

Los equipos utilizados para la medición de DSC, realizan la medición mediante algunas de las dos formas posibles, que son conocidas como DSC de compensación de potencia y DSC de flujo térmico. En el DSC de compensación de potencia, la muestra y los materiales de referencia se mantienen a la misma temperatura mediante el uso de elementos de calentamiento individualizados y el parámetro observable registrado es la diferencia de la entrada de potencia a los dos calentadores. En DSC de flujo térmico, simplemente se monitorea el diferencial térmico entre la muestra y los materiales de referencia [26].

2.6.3 Espectroscopia infrarroja (IR)

La espectroscopía infrarroja (IR) es una técnica muy versátil que es generalmente utilizada para identificar e investigar la composición de una muestra. Actualmente ésta técnica se realiza casi exclusivamente en espectrómetros de infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). La técnica está basada en la respuesta vibratoria de la molécula o átomos cuando se expone a una radiación infrarroja.

El espectro infrarrojo puede ser dividido en tres regiones; en infrarrojo cercano ($14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), medio (aproximadamente $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) y lejano, que son así nombrado por su relación con el espectro visible, siendo la región media más utilizada para el estudio de vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional.

En el estudio por IR, las mediciones se pueden realizar por absorción o reflexión como es: la reflectancia difusa (DRS) y la reflectancia total atenuada (ATR). Los dos métodos de medición utilizan el mismo principio, la absorción de la radiación IR en frecuencias de resonancia que corresponden a los modos vibracionales de grupos moleculares o cristales del material. Es decir, que a medida que pasa o se refleja un haz de luz a través de una muestra ya sea sólida o líquida, donde las moléculas al ser expuestas a IR, absorben energía que corresponden a su frecuencia de resonancia y transmiten las frecuencias no absorbidas que son registradas por un detector, permitiendo la identificación de aquellas que fueron absorbidas [20].

Para que una molécula muestre absorción en el infrarrojo tiene que poseer una característica en específico: un momento dipolar eléctrico debe cambiar durante el

movimiento, es decir, la interacción de la radiación infrarroja con la materia origina cambios en los dipolos moleculares asociados a vibraciones y rotaciones de grupos funcionales presentes en el compuesto. Las vibraciones pueden ser vistas como un cambio en la longitud de la unión (estiramiento) o en el ángulo de unión (flexión), mientras que algunos enlaces pueden estirarse en fase (estiramiento simétrico) o fuera de fase (estiramiento asimétrico), entre otros modos vibracionales [27].

Los espectrómetros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) modernos emplean un interferómetro y explotan el proceso matemático bien establecido de la transformación de Fourier. El equipo interferómetro más común es la espectrometría FTIR el cual utiliza el principio de Michelson (Figura 6), donde la radiación primero golpea a un divisor o separador que divide el haz de la luz en dos partes iguales (espejo semirreflejante). Los dos haces de luz interfieren en el divisor posterior a su viaje de vuelta cuando son reflejados sobre otros dos espejos. Uno acomodado frente a la trayectoria del haz original (espejos móviles) y el otro perpendicular (espejo fijo). La muestra es colocada en esta trayectoria y posteriormente se encuentra el detector IR, donde la intensidad resultante de la superposición de los dos haces es medida como función del desfase o desfases del espejo móvil en su desplazamiento respecto la posición intermedia.

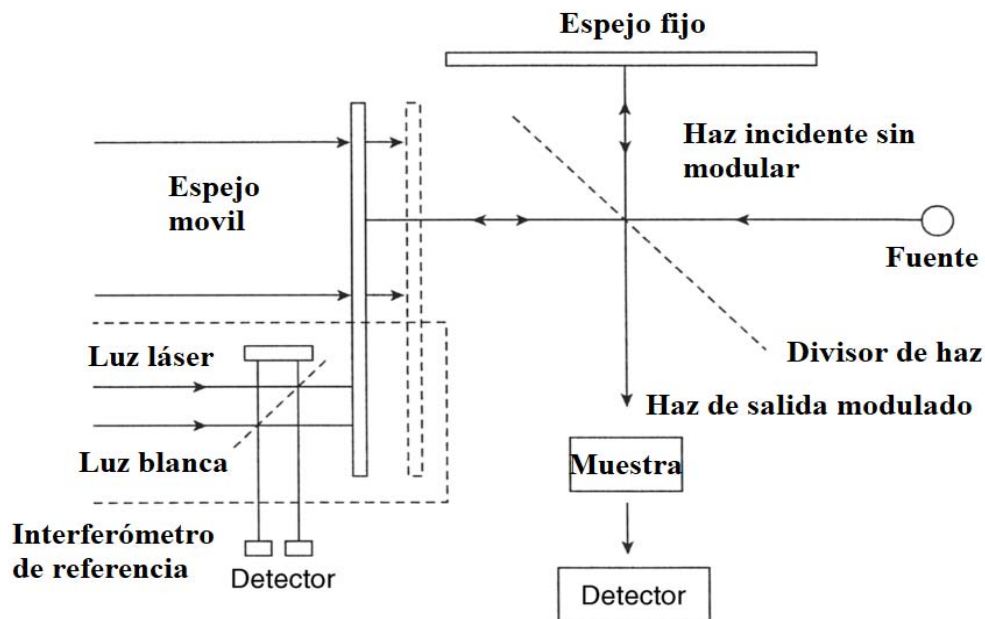


Figura 6 Esquema de un interferómetro de Michelson

Un ejemplo de un espectro IR se observa la Figura 7, espectro característico del 2-hexanona ($C_6H_{12}O$), donde en el eje horizontal se grafican las longitudes de onda IR expresadas en número de onda (cm^{-1}), y en el eje vertical se grafica la transmitancia (%) que se refiere a la luz absorbida, donde al 100 % de transmitancia significa que no hubo absorción por parte de la muestra en ese número de onda. En este espectro se observa la absorción característica del doble enlace carbonilo, en 1716 cm^{-1} y de los enlaces carbono-hidrógeno tetraédricos en el pico dentellado entre $(2900-3000)\text{ cm}^{-1}$; también se observan otros picos en la región de $(400-1400)\text{ cm}^{-1}$ que son parte de picos característicos de la 2-hexanona considerándose parte de su huella dactilar de este compuesto.

Es importante recordar que un espectro IR característico es un patrón o huella dactilar de la molécula en su composición total, en lugar a un grupo específico dentro de la molécula.

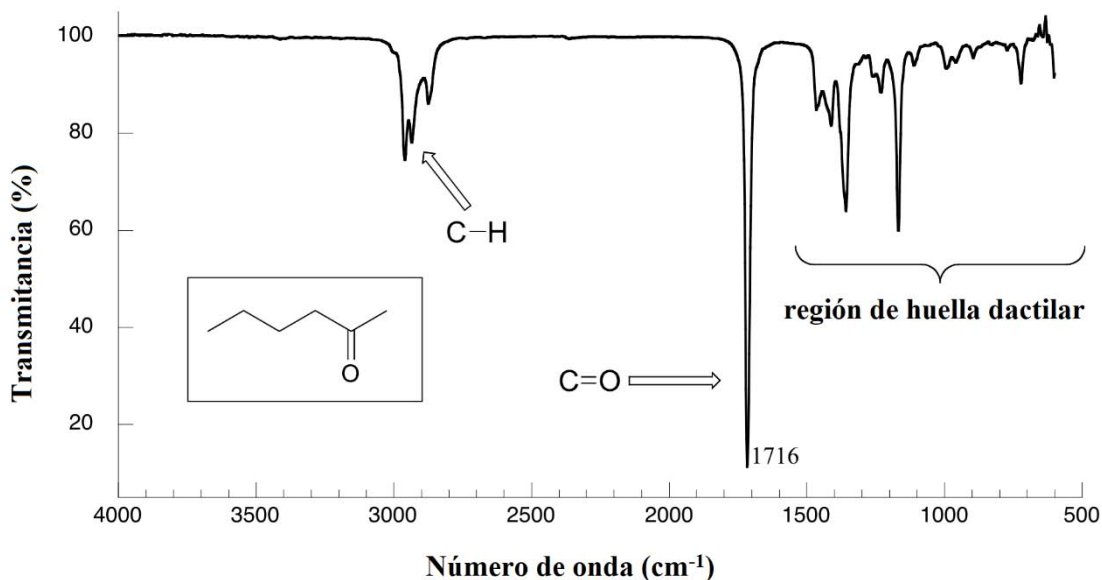


Figura 7 Espectro IR característico de 2-hexanona

2.6.4 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica de caracterización experimental para el estudio y análisis de materiales con características cristalinas basada en el fenómeno de difracción de los rayos X en un sólido cristalino.

La técnica de DRX es un método que nos permite la identificación de fases cristalinas, defectos estructurales, grado de desorden cristalino, orientación preferencial, tamaño de grano y tensiones, entre otros [25]. La cantidad de muestra necesaria para DRX en polvo, dependiendo de la configuración del equipo, es entre 1 a 10 mg dependiendo de la densidad del material y el tamaño del portamuestra, que ha sido triturado a tamaño de partícula finas en consideración de la naturaleza del material [20].

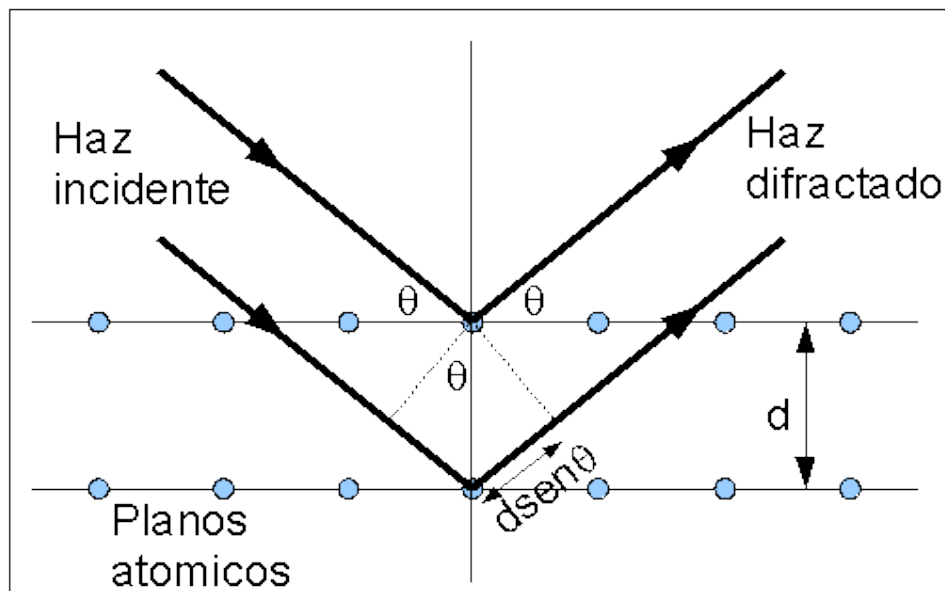


Figura 8 Diagrama de la difracción de un haz en un material cristalino, Ley de Bragg.

El principio físico de la difracción de rayos X, radica cuando un haz monocromático de rayos X se hace incidir (haz incidente o primario) a un material cristalino donde posteriormente es observado la reflexión o difracción (haz difractado) de los rayos X en varios ángulos con respecto al haz primario (Véase Figura 8). Donde la difracción sólo es dada cuando se cumple la condición de la Ley de Bragg, que establece la relación entre la longitud de onda de la radiación de rayos X (λ), el ángulo de difracción (θ) y la distancia

entre cada plano atómico de la red cristalina (d_{hkl}), cumpliendo un orden de reflexión (n) de un número entero mayor o igual a 1 (Ec. 1).

$$n\lambda = 2d_{hkl}\text{sen}\theta \quad \dots \dots \dots \text{Ec. (1)}$$

De la condición de la Ley de Bragg se pueden calcular las distancias interplanares del material cristalino, reordenando la ecuación de la siguiente forma (Ec. 2):

$$d_{hkl} = \frac{n\lambda}{2\text{sen}\theta} \quad \dots \dots \dots \text{Ec. (2)}$$

Los espaciamientos interplanares dependen únicamente de la geometría de la celda unitaria del cristal, mientras que las intensidades de los rayos X difractados dependen del tipo de átomos en el cristal y la ubicación de los átomos en la unidad fundamental repetitiva, la celda unitaria [25]

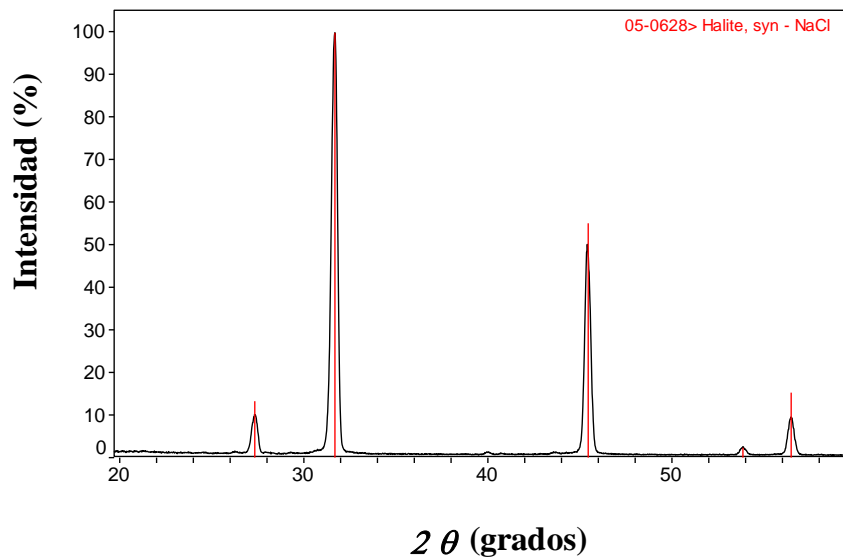


Figura 9 Patrón de difracción de rayos X característica del NaCl

Los resultados obtenidos mediante el uso de esta técnica son presentados mediante un difractograma de rayos X. Como ejemplo, se muestra el patrón de DRX de la sal de mesa (NaCl) en la Figura 9, donde se observan picos de diferentes intensidades en función de un ángulo 2θ de difracción, este patrón de difracción es característico de cada material.

Generalmente en los difractómetros para producir rayos X se utiliza un tubo de rayos X conformado por dos electrodos (ánodo y cátodo), donde los electrones producidos en el cátodo se aceleran hacia el ánodo metálico (blanco) mediante una diferencia de potencial de hasta 100 kV; cuando los electrones chocan con el blanco, parte de la energía del haz se convierte en rayos X y se emite en todas direcciones [28], generando un espectro continuo de longitudes de onda con diferentes variaciones de intensidad dependiendo del voltaje y material del tubo. Sin embargo, cuando los electrones que son acelerados en el tubo de rayos X alcanzan una cierta energía crítica y son capaces de arrancar electrones más internos de los átomos que componen el blanco, provocarán que los átomos se encuentren en un estado supremamente excitado, que eventualmente, los átomos regresarán a su estado de equilibrio emitiendo un conjunto de fotones de alta frecuencia, produciendo así el espectro característico del blanco utilizado.

2.6.5 Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES)

La espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES) es una técnica de análisis muy útil para la determinación composicional de elementos químicos en una muestra. El principio básico de la técnica radica en exponer la muestra en un plasma para producir átomos e iones excitados que emiten espectros de emisión atómica en longitudes de ondas características de un elemento en particular, posteriormente procesado en un sistema informático [29].

Las muestras en forma de líquido o gas se pueden inyectar de forma directa en el equipo, mientras que las muestras sólidas normalmente se requieren extracción o digestión ácida empleando HNO_3 y HCl para que los analitos (elemento, compuesto o ion) estén presentes en una solución líquida para posteriormente ser introducidos en el equipo.

El funcionamiento general del equipo se muestra en el diagrama de la Figura 10, se empieza con la inyección continua de la muestra en forma líquida mediante el uso de una bomba peristáltica, posteriormente el líquido se convierte en un aerosol a través de un proceso conocido como nebulización por medio de un flujo continuo de argón pasando a la cámara de vaporización.

La muestra en forma de aerosol se transporta luego al plasma (antorcha del plasma acoplado inductivamente por radio frecuencia) y, debido a las altas temperaturas, los analitos son atomizados e ionizados generando espectros de emisión atómica de líneas características que serán visualizados y recopilados en una configuración radial y/o axial dependiendo del equipo.

Posteriormente los espectros son separados en sus diferentes longitudes de onda individuales para poder identificar la emisión de cada especie excitada y su intensidad mediante un sistema de monocromadores y policromadores. Para la detención real de la luz, después de haber separado las longitudes de onda de otras, se utiliza un detector fotosensible tal como un tubo fotomultiplicador (PMT) o técnicas de detención avanzadas tales como un dispositivo de inyección de carga (CID) o un dispositivo de carga [29], [30]. La radiación detectada se convierte en señales electrónicas que a su vez se convierte en información que es procesada por un sistema informático.

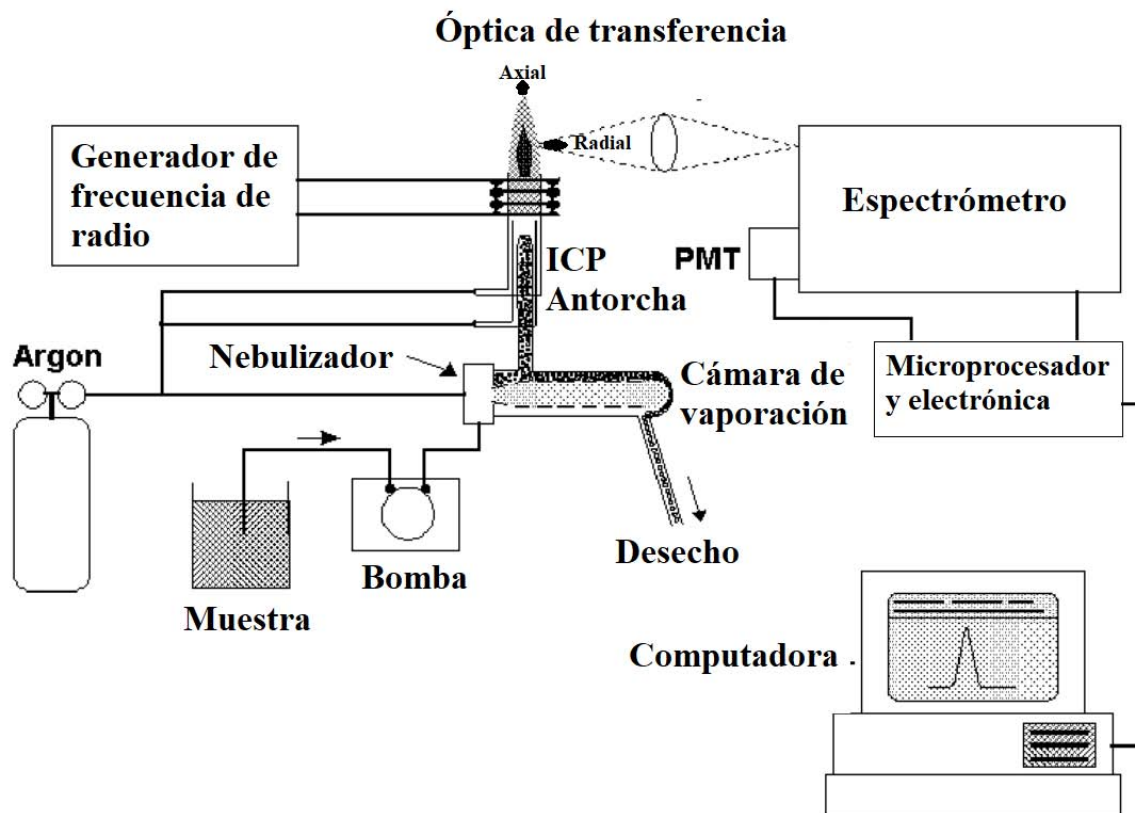


Figura 10 Diagrama general del funcionamiento de un equipo de ICP- OES. La muestra es inyectada y convertida en aerosol en un proceso de nebulización para ser expuesto en la antorcha del ICP. Los analitos al ser expuesto a la antorcha producen átomos e iones excitados que emiten espectros de característicos de un elemento en particular. Son detectados y procesador a través de un procesado en un sistema informático.

2.6.6 Microscopia electrónica de barrido

En el estudio de la naturaleza física de la superficie de un material es comúnmente utilizado el microscopio óptico, sin embargo, la resolución del microscopio está limitada por la longitud de onda de la luz (400-700) nm, es por ello que actualmente se utilizan otras técnicas de mayor resolución, como es el microscopio electrónico basado en el uso de electrones, debido a que, tiene longitudes de onda mucho más pequeñas (0.003-0.01) nm en comparación con la luz, permitiendo una mejor resolución de objetos más pequeños a escala nanométrica.

Las dos principales técnicas de microscopia electrónica son el microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) y el microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés). El primero es generalmente utilizado para la obtención de imágenes de la morfología superficial, mientras que el segundo es usado para el sondeo de la estructura, proporcionando información de detalles microestructurales que no se pueden ver de manera superficial [20], [28].

El principio básico del SEM es el de hacer incidir un haz de electrones finamente enfocado en la superficie de una muestra sólida, donde al interactuar los electrones con la muestra se producen varios tipos de señales tales como los electrones retrodispersados, los secundarios y Auger; fotones de fluorescencia de rayos X y otros fotones de varias energías, que pueden ser recolectados en disposición a los detectores disponibles, para posteriormente ser procesados a través de una computadora y formar una imagen [28].

Las dos partes principales del SEM son la columna del microscopio y el sistema electrónico (Figura 11). La columna del microscopio está conformada por un cañón de electrones (compuesto por un cátodo, cilindro Wehnel y ánodo), uno o dos lentes condensadores, dos pares de bobinas de deflexión del haz (bobinas de escaneo para deflexión X, Y), el objetivo y algunas aperturas.

En la cámara de la muestra, en el extremo inferior de la columna del microscopio, se ubica la base y los detectores de las diferentes señales generadas por la interacción de los electrones con la muestra (el número de detectores puede variar dependiendo de la configuración del equipo). Tanto la columna del microscopio como la cámara de la muestra se encuentran en un medio de alto vacío gracias al uso combinado de bombas de vacío y alto vacío con la finalidad de que los electrones del haz viajen del cátodo a la muestra con poca interacción con las moléculas del gas residual.

El sistema electrónico consiste en el control y suministro de la energía eléctrica para la tensión de aceleración (el rango habitual es de alrededor de (0.5–3) kV), así como el condensador y las lentes objetivas, el generador de escaneo y los amplificadores electrónicos para las diferentes señales adquiridas. En los equipos más modernos de SEM el control es realizado mediante la ejecución de un software especializado en una computadora, donde se es capaz de controlar y modificar los parámetros del microscopio permitiendo la obtención y el almacenaje de imágenes digitales [31].

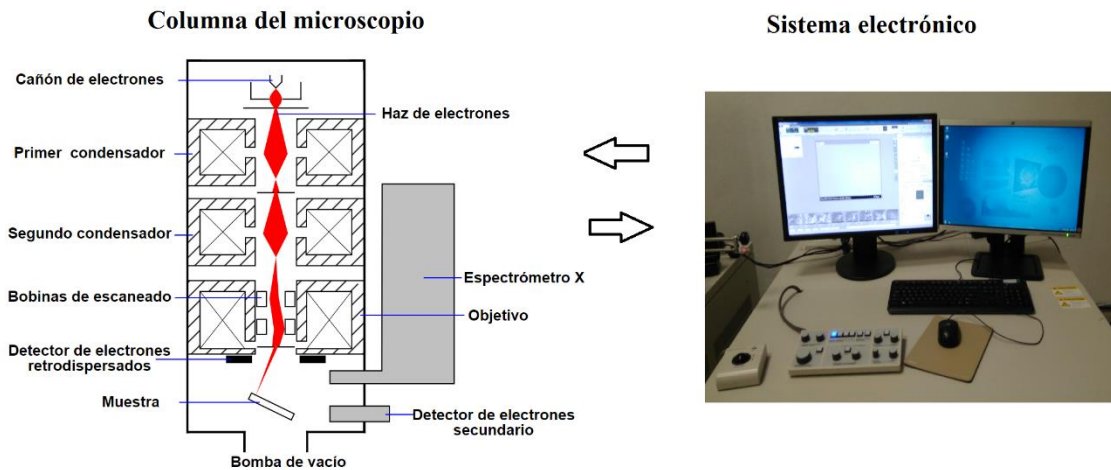


Figura 11 Esquema del microscopio electrónico de barrido (SEM)

METODOLOGÍA

3.1 Obtención de polvo de hueso de porcino

Para la obtención de polvo de hueso de porcino, se hizo uso de la metodología ya reportada por Ramírez-Gutiérrez et al. [32] esquematizado en el diagrama de bloque de la Figura 12. Primero se partió de hueso fémur de porcino obtenido en la plaza comercial de Santa Rosa Jáuregui, Querétaro, Querétaro. Esta metodología consiste en un proceso de tres etapas que se explican a continuación:

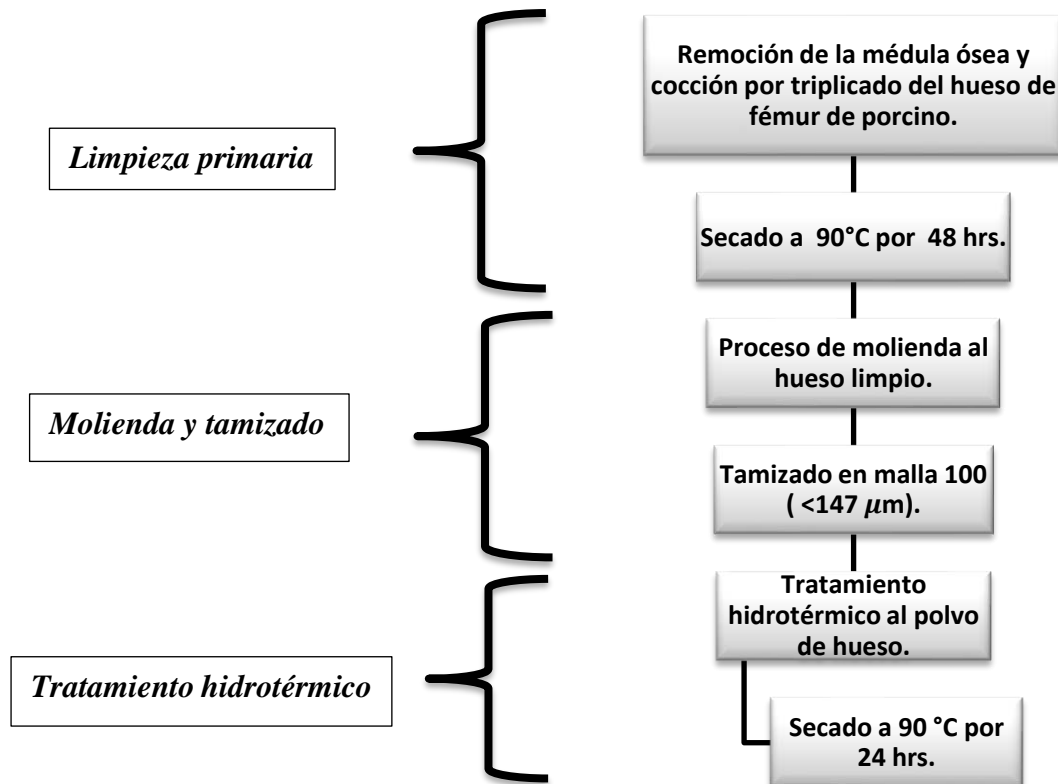


Figura 12 Diagrama de bloques para la obtención de bio-Hap, metodología ya reportado en la literatura.

3.1.1 Limpieza primaria

En la primera etapa se realizó una limpieza primaria al hueso de fémur de porcino adquirido, teniendo como objetivo conservar solo el hueso cortical o compacto (ver Figura 13). Se inició el proceso mediante la remoción manual de toda la materia orgánica blanda (limpieza parcial). Para facilitar aún más esta limpieza se llevó a cabo una cocción por triplicado en agua destilada durante una hora y cambio de agua destilada por cada repetición. Una vez terminada la cocción, se realizó una remoción completa de todo el tejido blando restante visible en el hueso. Por último, se dejó secar en un horno a una temperatura constante de 90° C por 5 días y después se llevó al proceso de molienda y tamizado, segunda etapa.

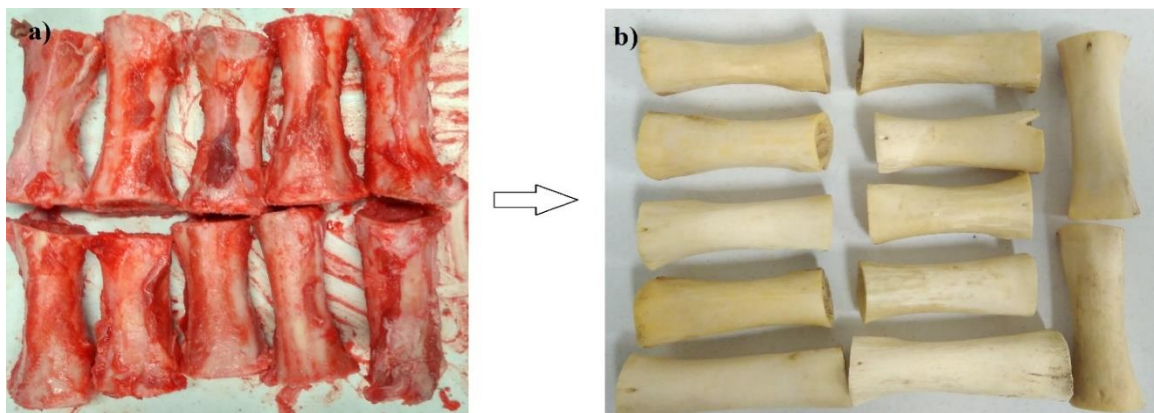


Figura 13 Limpieza primaria. a) Hueso adquirido. b) Hueso limpio posterior a la remoción de materia orgánica

3.1.2 Molienda y tamizado

En la segunda etapa, el hueso cortical de fémur de porcino ya seco se trituró a partículas menores a 5 mm con ayuda de un mortero metálico para rocas, posteriormente el hueso triturado fue llevado a un molino oscilatorio con anillos de carburo de tungsteno del laboratorio de molienda del Centro de Geociencias de la UNAM-Juriquilla, con capacidad de 40 a 80 gramos por carga, para moler el hueso durante tres minutos (ver Figura 14). Se obtuvo polvo de hueso que fue tamizado en una malla del número 100, tamaño de partículas menores a 149 μm , realizándose después un tratamiento hidrotérmico, etapa tres.



Figura 14 Proceso de molienda. Se trituro con un mortero el hueso y posteriormente con un molino giratorio con anillos de tungsteno para obtener partículas de hueso finas.

3.1.3 Tratamiento Hidrotérmico

En la tercera etapa, al polvo de hueso de porcino con tamaño de partículas menores a 149 μm (tamaño conveniente para la realización de los diferentes métodos de caracterización realizadas posteriormente) se le realizó un tratamiento hidrotérmico centrado, en lo posible, en la desnaturalización y remoción de proteínas, colágeno y grasa. El proceso se realizó en una autoclave a 159 °C con una presión de 1.36 atm con la relación de 1 litro de agua destilada por cada 100 g de polvo de hueso de porcino, durante 30 minutos (ver Figura 15), este proceso se repitió tres veces con cambio de agua en cada ocasión. Por último, se deja secar el polvo de hueso de porcino, ya con tratamiento hidrotérmico (HPTH), en un horno a 90° C durante 48 horas.



Figura 15 Autoclave usado para el tratamiento hidrotérmico.

3.2 Obtención de bio-Hap por el método de incineración

Para la obtención de bio-Hap de porcino se partió del polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico (HPTH) que fue sometido a un proceso de incineración a diferentes condiciones en una mufla de la marca felisa® modelo FE-361, realizando el control de temperatura con un controlador novus® N480D, esto con el propósito de estudiar y analizar los cambios estructurales de la bio-Hap generados por el tratamiento térmico implementado.

Las condiciones térmicas fueron definidas de acuerdo con la revisión bibliográfica y resultados obtenidos previamente por el análisis térmico por TGA/DSC. Se estableció una primera región de estudio de 500 a 600 °C con el interés de observar la morfología del grano de Hap en temperaturas de baja incineración y con la ausencia de materia orgánica, siendo la Fase I del experimento, y una segunda a región de 620 a 820 °C, asegurando la eliminación de la fase orgánica a temperaturas mayores a 600 °C [33], correspondiente a la Fase II del experimento.

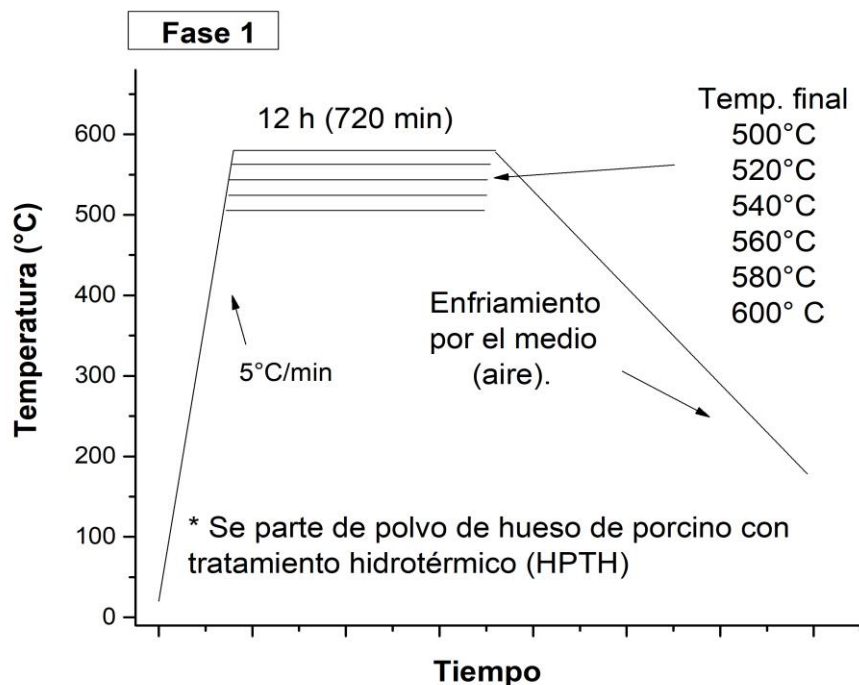


Figura 16 Fase I: Diseño experimental del perfil térmico para la obtención de bio-Hap de porcino

La Fase I consistió en obtener 6 muestras de bio- Hap de 500 °C a 600 °C cada 20 °C, a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min con un tiempo de sinterización de 12 horas y dejándolo enfriar por el medio (aire) a partir de muestra de HPTH, como se observa en el perfil térmico de Figura 16.

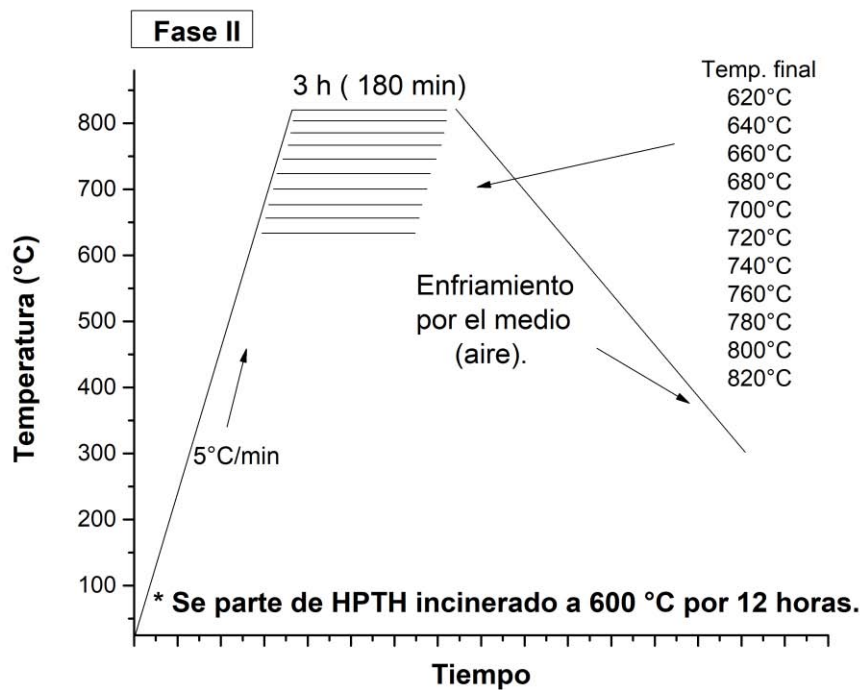


Figura 17 Fase II: Diseño experimental del perfil térmico para la obtención de bio-Hap de porcino

En la Fase II, se partió de muestra de HPTH incinerado a 600 °C a 5 °C/min durante 12 horas para asegurar la obtención de Hap libre de materia orgánica. Posteriormente se realizaron 11 incineraciones por separado de acuerdo con el perfil térmico que se muestra en la Figura 17, de 620 °C a 820 °C a una velocidad de 5 °C/min y un enfriamiento por el medio.

Las muestras obtenidas fueron almacenadas en bolsas con cierre y rotuladas con las condiciones de tratamiento térmico para su futura caracterización.

3.3 Caracterización Fisicoquímica

3.3.1 Análisis térmico por TGA/DSC

Se realizó análisis térmico por TGA y DSC de forma simultánea al polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico (HPTH) con el objetivo de estudiar los diferentes eventos térmicos ocurridos en la muestra al ser sometida a una rampa de calentamiento.

En un crisol de alúmina con tapa se depositó 9.0 ± 0.5 mg de HPTH y se colocó en el equipo TGA/DSC 2 STAR[®] System (véase fig. 14), configurado a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min de 25°C hasta 1100 °C, en un medio de aire.

Los resultados obtenidos fueron analizados e interpretados empleando el software Origin Pro 9.0, información que permitió establecer las temperaturas de incineración para la obtención de bio-Hap.

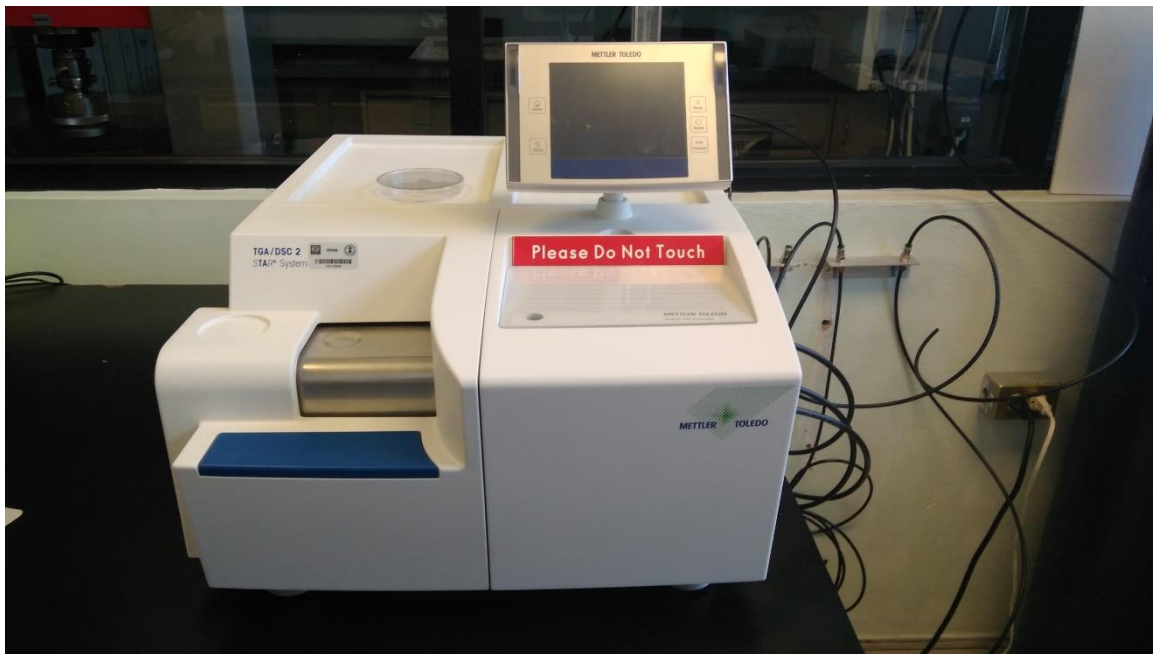


Figura 18 Equipo de TGA/DSC 2 STAR[®] System.

3.3.2 Análisis por espectroscopía IR

Se realizó identificación de los diferentes grupos funcionales de las muestras mediante espectroscopia infrarroja en el equipo de IR marca Bruker Vector 33 (Figura 19), con espectrómetro de IR mediano y cercano con transformada de Fourier (FTIR). Las muestras se analizaron en polvo tamizados previamente en malla #100 (tamaño de partícula menores a $14\mu\text{m}$) mediante reflexión total atenuado (ATR por sus siglas en inglés), con 24 repeticiones. Los datos fueron analizados utilizando el software Origin Pro 9.



Figura 19 Espectrofotómetro IR Bruker Vector 33

3.3.3 Análisis cristalográfico por DRX

Se realizó difracción de rayos X con el fin de determinar los cambios estructurales y microestructurales de las muestras que fueron sometidas a diferentes condiciones de incineración de la Fase I y II. Mediante el uso del difractómetro Ultima IV de Rigaku (Figura 20) operando a 40Kv, con una corriente de 30 mA, tubo de cobre cuya longitud de onda es 1.54 Angstrom, obteniendo los difractograma de 5 a 80 grados en 2θ con una velocidad de 2 grados por minuto.

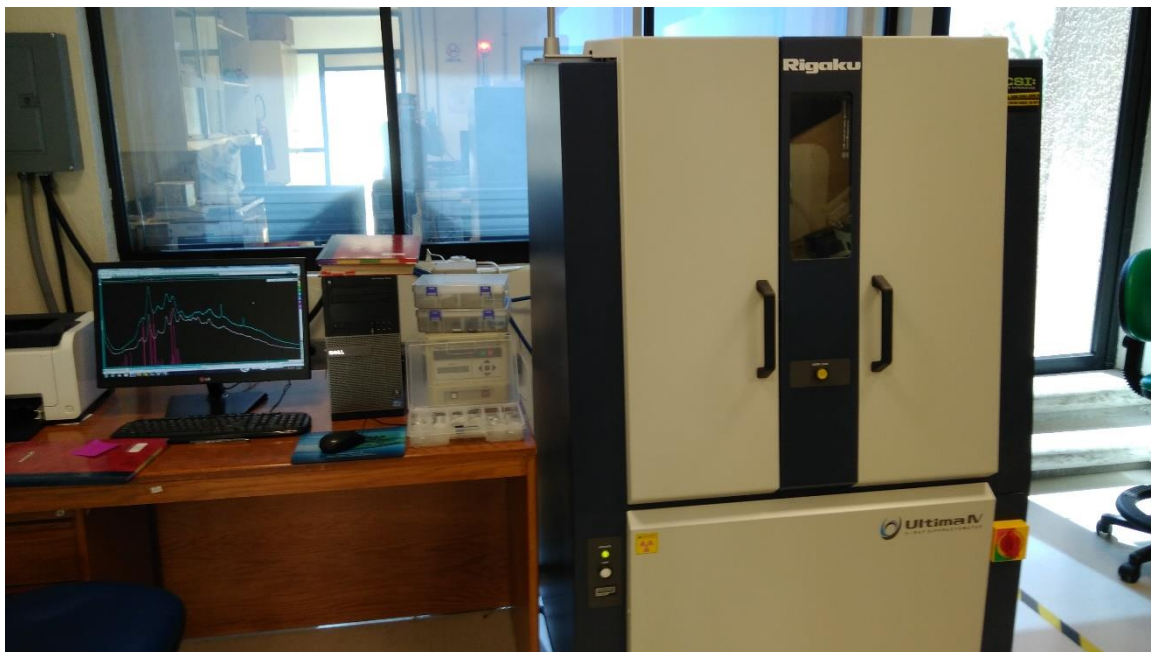


Figura 20 Difractómetro Ultima IV-Rigaku.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el uso de software MDI Jade 6.0 que permitieron la identificación de fases cristalinas y cálculo del FWHM.

3.3.4 Análisis composicional por ICP-OES

Para la determinación composicional cuantitativa de la fase inorgánica de las muestras de bio-Hap se utilizó la técnica de espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES por sus siglas en inglés). La preparación de las muestras Bio-Hap para ser analizadas por el ICP-OES consistió en una digestión ácida, en un sistema cerrado por microondas utilizando un Mars Xpress de la marca CEM (Figura 21 a). Para ello, se pesaron por duplicado 0.1 g de muestra y se agregaron 7 ml ácido nítrico al 69-70 % (JT Baker grado Instra) sometiéndolo a una rampa de calentamiento de temperatura ambiente a 190 °C durante 15 minutos. Posteriormente se filtró utilizando membranas de filtración con un tamaño de poro de 0.45 μm , con el fin de evitar obstrucciones en el equipo, y se aforó a 100 ml con agua desionizada.

Por último las muestras fueron analizadas por duplicado en el espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado por inducción Thermo iCAP 6500 Duo View (Figura 21 b). Para calibrar el equipo se utilizaron 7 estándares preparados a partir de un estándar certificado multi elemental (HIGH-PURITY STANDARDS), y un estándar interno de Itrio como corrector de interferencia de la matriz. En la calibración se obtuvieron coeficientes de correlación por arriba de 0.99, y se analizó una muestra de control de laboratorio para verificar el desempeño del equipo.



Figura 21 a) Microondas Mars Xpress de la marca CEM. b) Equipo ICP-OES Thermo iCAP 6500 Duo View

3.3.5 Análisis morfológico por SEM

A las muestras obtenidas de la Fase I y II, se les realizó un análisis de microestructura superficial mediante el uso de Microscopio Electrónico de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) en el equipo Hitachi SUB230 (Figura 22). El análisis fue realizado utilizando voltajes de aceleración de electrones de 1.0 kV y alto vacío utilizando como señal los electrones secundarios (SE) y electrones retrodispersados (BSE) a una resolución de x100K.

Las muestras se prepararon en porta muestras de aluminio fijadas con grafito coloidal en base de alcohol.

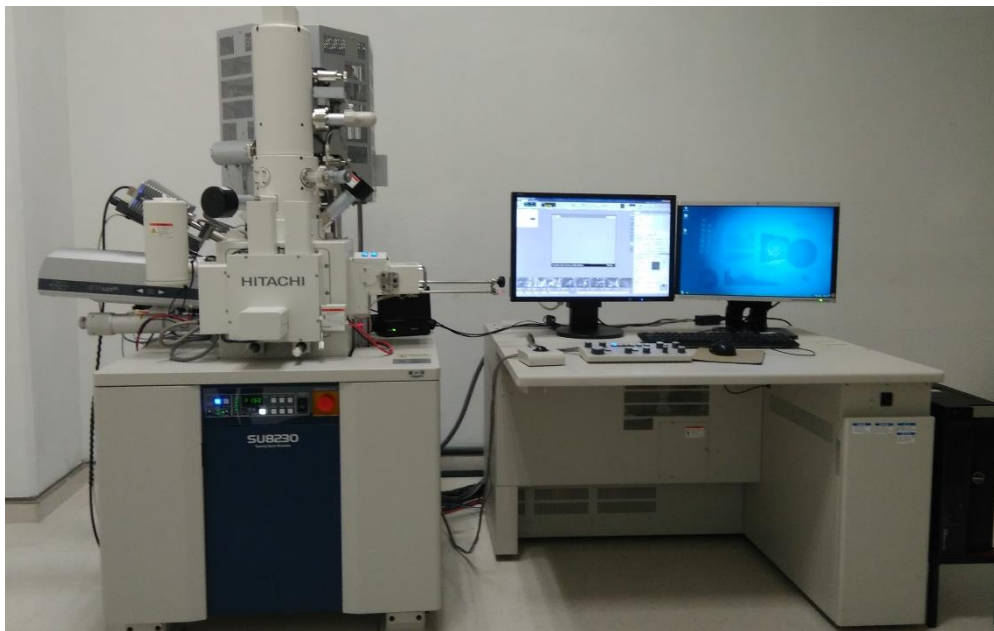


Figura 22 Microscopio electrónico de barrido Hitachi SUB230

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización térmica por TGA y DSC

Los análisis térmicos tales como el TGA y el DSC son técnicas muy útiles para el estudio de los cambios fisicoquímicos de un material en respuesta a un proceso de calentamiento, visto en el TGA como la degradación de diferentes fases (orgánicas e inorgánicas), y en el DSC como la variación del flujo de calor de la muestra.

Los resultados del análisis de la muestra de polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico (HPTH), obtenidos por las dos técnicas anteriormente mencionadas, se observan en la Figura 23. En un primer instante en la interpretación de la curva termogravimétrica y con ayuda de la primera derivada (Figura 23a) se observan tres regiones sucesivas de pérdida de masa y una cuarta región con una leve ganancia de masa; y en relación con la curva de flujo de calor y con el apoyo de la segunda derivada (Figura 23b). Se identificaron los fenómenos térmicos ocurridos en cada región, que son los siguientes:

- En la primera región (Reg. I), en el rango 25 °C a 194.6 °C, se obtuvo una pérdida de masa del 3.7 % que es atribuido a la evaporación de agua adsorbida visto en el DSC como un fenómeno endotérmico alrededor de la temperatura de 55.22 °C [34].
- En la segunda región (Reg. II), en el rango de 194.6 a 500 °C, se observa una pérdida de masa del 16.8% que es generalmente atribuida a la combustión y degradación de la fase orgánica del material, visto en el DSC como un primer pico exotérmico los 327 °C y otro pico exotérmico débil a los 441 °C que es la continuación de la combustión del colágeno tipo I y parte de proteínas [12], [33].

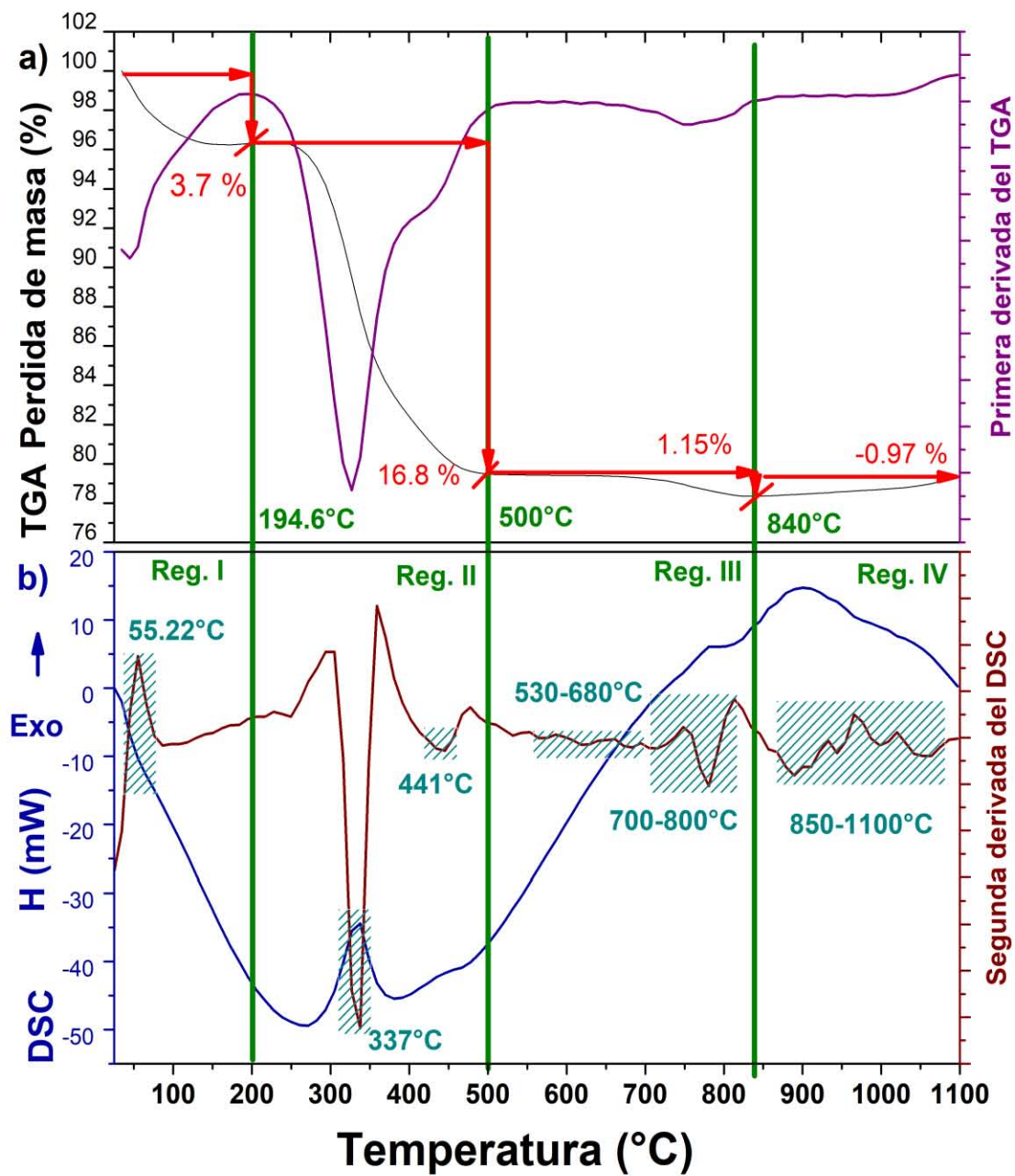


Figura 23 Resultados de los análisis térmicos. a) Curva termogravimétrica (TGA) y su primera derivada. b) Curva calorimétrica (DSC) y su segunda derivada.

- En la tercera región (Reg. III), en el rango de 500 °C a 840 °C, con una pérdida de masa del 1.15 % es atribuida en una primera fase a la descomposición del carbonato estructural visto en el DSC como una serie de eventos endotérmicos débiles registrados en el rango de temperatura de 530 a 680 °C posiblemente por la liberación de gas de dióxido de carbono estructuralmente limitado y en un rango de temperatura de 700 a 800 °C se observa un evento endotérmico acaso a la descarboxilación de carbonatos estructuralmente no implicado [35], [36].
- En la cuarta región (Reg. IV), en el rango de 840 °C a 1100 °C, con una ganancia de masa del 0.97 %, es debido a la formación de óxidos al estar en una atmosfera oxidante (aire), formación de otras fases cristalinas tales como oxapatita, fosfato tricálcico (β -TCP), y un inicio de un proceso de deshidroxilación ya reportados en la literatura que son observados en el DSC como una serie de eventos térmicos [12].

La región III muestra ser una región de interés para la obtención y el estudio de bio-Hap, ya que se lleva a cabo la eliminación de materia orgánica para prevenir el contagio de enfermedades y reacciones inmunológicas defensivas en caso de ser usado como injerto [6] y, al no llevar el material a temperaturas tan altas, se puede obtener un material de mayor semejanza al hueso, dado a que se previene en lo posible la formación de otras fases cristalinas [37]. Estos resultados y la revisión bibliográfica realizada permitieron establecer el diseño experimental establecido en dos fases que se describieron en la metodología del presente trabajo.

4.2 Muestras obtenidas de bio-Hap

De acuerdo con el diseño experimental de la Fase I, descrita anteriormente, se recopilaron los datos en tiempo real del perfil térmico de las 6 muestras obtenidas de 500 a 600 °C por el método de incineración, como se muestra en la Figura 24, esto demuestra un buen control de la mufla y la seguridad de la obtención de las muestras con los parámetros térmicos establecidos.

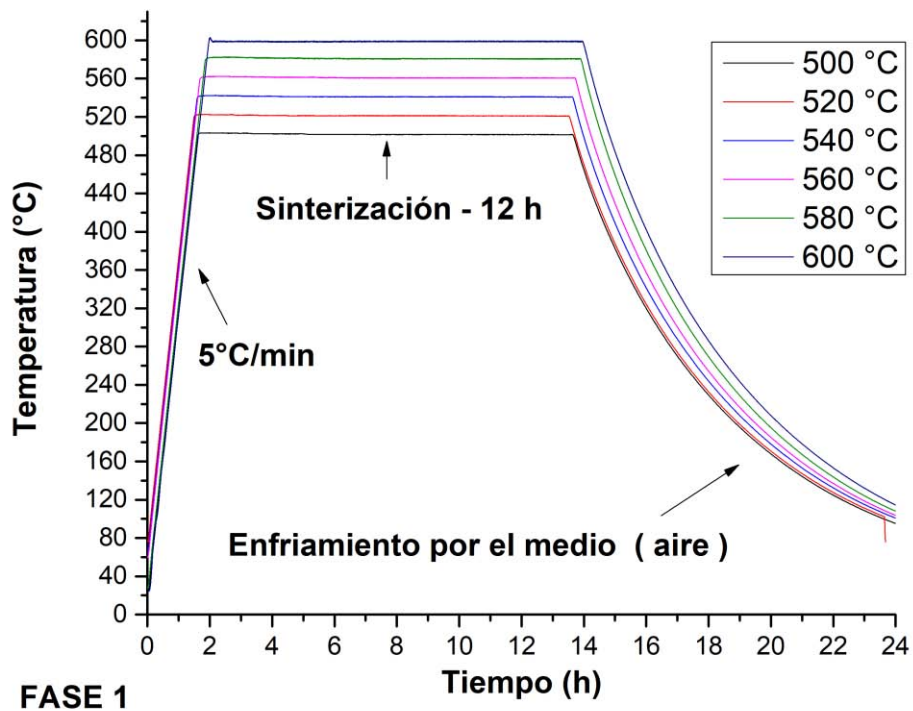


Figura 24 Perfiles térmicos de la Fase 1.

Las muestras obtenidas de la Fase I presentaron diferentes tonalidades de grises, como se observa en la Figura 25, a causa de la presencia de carbono producida por la combustión de la fase orgánica que aún no ha reaccionado completamente con el medio para la producción y evaporación de CO₂.

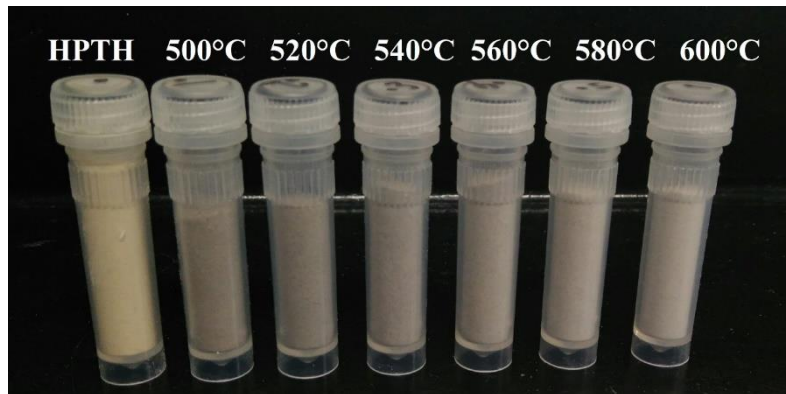


Figura 25 Muestras obtenidas de la Fase I.

Los datos de los perfiles térmicos recopilados en tiempo real de las 11 muestras de la Fase II se muestran en la Figura 26. Como en lo ocurrido en la Fase I, se demuestra un buen control de incineración y la seguridad de la obtención de las muestras con los paramétricos térmicos establecidos.

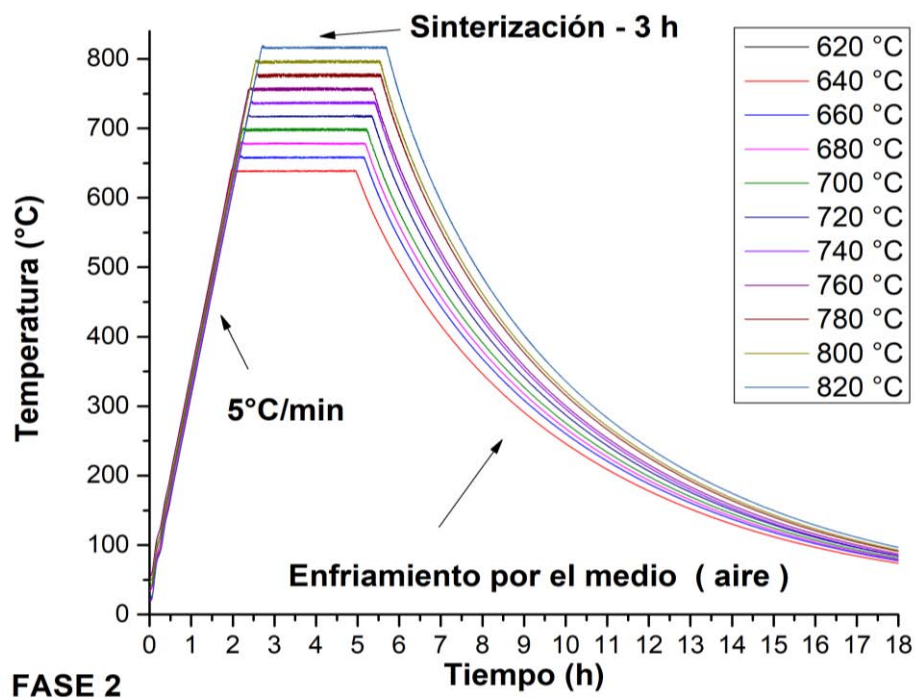


Figura 26 Perfiles térmicos de la Fase II

Las muestras obtenidas en la Fase II se observan en la Figura 27, ordenados de izquierda a derecha de 620 hasta 820 °C, con la tonalidad del polvo de color blanco, esto es un indicador de una degradación y evaporación completa de la fase orgánica. Posteriormente fueron caracterizados por diferentes técnicas, descrita en los apartados siguientes.



Figura 27 Muestras obtenidas de la Fase II

4.3 Espectroscopía IR

La comparación de los espectros infrarrojos obtenidos a partir del análisis de las muestras de la Fase I y II pueden ser usados como indicadores de la eliminación de componentes orgánicos e inorgánicos, provocados por las diferentes temperaturas de incineración, esto es posible porque los distintitos tipos de enlaces químicos presentes en diversos componentes del hueso dan bandas de absorción infrarroja características. Las pérdidas en el material pueden ser observadas en el espectro IR como un cambio en las intensidades y posiciones de sus correspondientes bandas de absorción [38].

Los resultados obtenidos por el análisis de espectroscopia IR del polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico (HPTH) y las muestras de la Fase I y II se observan en los espectros de la Figura 28 y Figura 29 respectivamente, y en la Tabla 3.

La muestra en la que se observa mayor cantidad de bandas, en el espectro IR, es la HPTH, por ser una muestra sin incinerar. Las bandas presentes son las siguientes:

- En 1018 cm^{-1} junto con la de 1087 cm^{-1} , corresponden a la vibración de estiramiento asimétrica del grupo fosfato ($\nu_2 - PO_4^{3-}$), a diferencia de la banda 962 cm^{-1} , que se debe a la vibración del fosfato en modo de estiramiento simétrico ($\nu_1 - PO_4^{3-}$) [35].

- Las bandas en 875 y 1413 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de estiramiento asimétrico del ion carbonato (CO_3^{2-}) que se originan al incorporarse en la posición de un grupo fosfato (sustitución tipo B), mientras que la banda en 1458 cm^{-1} puede asignarse a carbonatos en la posición del grupo hidroxilo (sustitución tipo A). Estos dos tipos de sustitución pueden ocurrir simultáneamente, dando como resultado una sustitución AB mixta que constituye el mineral óseo [36], [38], [39].
- En 1546 y 1648 cm^{-1} son bandas asociadas con los grupos amida de proteínas, siendo el colágeno tipo I la fase mayoritaria de la fase orgánica del hueso, y también se observan enlaces C-H en 2854 y 2924 cm^{-1} [33], [34], [38].
- En la banda contenida entre 3100-3400 cm^{-1} indica la presencia de agua retenida en la superficie en el material

Tabla 3 Valores del espectro FTIR de HPT y de las muestras incineradas a diferentes condiciones determinados en el diseño experimental de la Fase I y la Fase II

Muestras		Número de onda (cm^{-1}) / Grupos funcionales				
		CO_3^{2-}	PO_4^{3-}	Amidas/ C-H	H_2O	OH^-
Fase I	HPTH	875,1413,1449	962,1018,1087	1546,1648/ 2854,2928	3100 - 3400	-
	500 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	-
	520 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	-
	540 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3572
	540 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3572
	580 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3572
	600 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3573
Fase II	620 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3573
	640 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3573
	660 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3573
	680 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3573
	700 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3573
	720 °C	875,1413,1449	962,1018,1087	-	-	3573
	740 °C	-	962,1018,1087	-	-	3573
	760 °C	-	962,1018,1087	-	-	3573
	780 °C	-	962,1018,1087	-	-	3573
	800 °C	-	962,1018,1087	-	-	3573
	820 °C	-	962,1018,1087	-	-	3573

En los resultados por espectroscopia IR de las muestras de la Fase I (temperaturas de 500 a 600 °C) (Figura 28) se observa en un primer instante la ausencia de las bandas asociadas

con la presencia de materia orgánica (Amidas/ C-H en 1546,1648/2854,2928 cm^{-1} respectivamente).

Estas conclusiones son respaldadas con los resultados obtenidos por TGA/DSC, que indica que la combustión de la fase orgánica se lleva a cabo a temperaturas menores a 500 $^{\circ}\text{C}$. Las bandas de vibraciones que corresponden al grupo fosfato (962,1018,1087 cm^{-1}) se vuelven más pronunciadas conforme se aumenta la temperatura de 500 a 600 $^{\circ}\text{C}$, mientras que en las bandas que corresponden al ion carbonato (875,1413,1449 cm^{-1}) sucede lo contrario: disminuye ligeramente su intensidad con el aumento de temperatura. En la banda de 3573 cm^{-1} se observa cómo se define un tenue pico presente en temperaturas de 540 a 600 $^{\circ}\text{C}$ gracias a la vibración de estiramiento de un grupo OH⁻ presente en la muestra [35], [40].

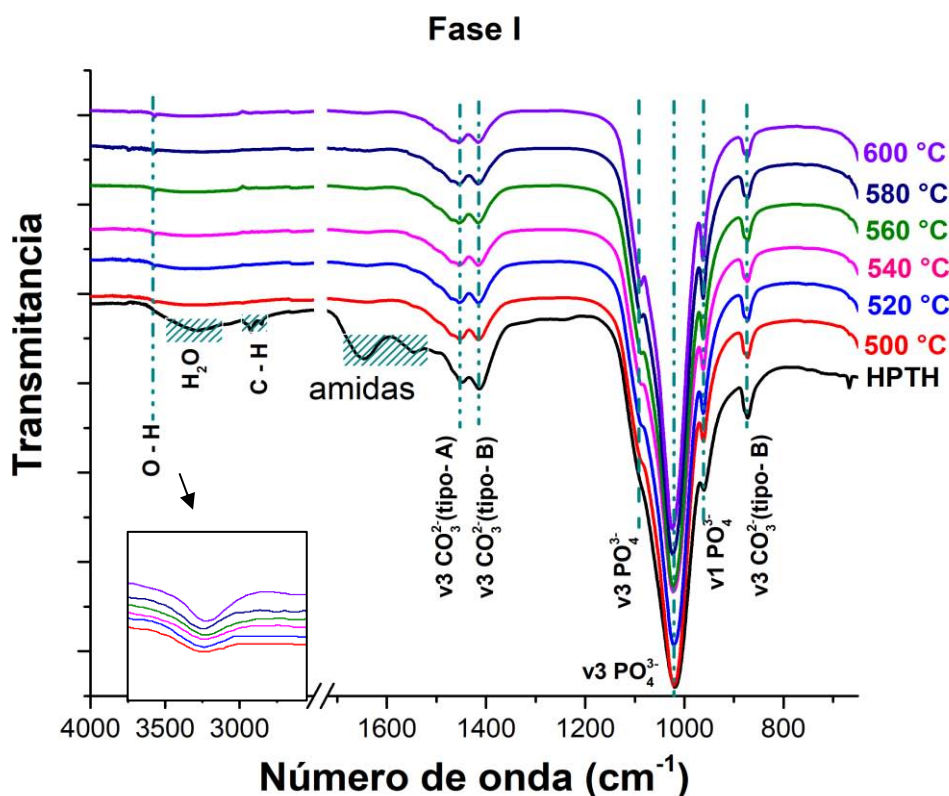


Figura 28 Espectros IR de las muestras obtenidas de la Fase I, HPTH y de 500 $^{\circ}\text{C}$ a 600 $^{\circ}\text{C}$

En el caso de los resultados obtenidos por espectroscopia IR de la Fase II, temperaturas de 620 a 820 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 29), todas las bandas están asociadas con los componentes inorgánicos, por lo tanto, es posible garantizar que en este rango de temperatura no existe

la presencia de materia orgánica. Las bandas del grupo fosfato ($962, 1018, 1087 \text{ cm}^{-1}$) se vuelven más intensas y pronunciadas conforme se aumenta la temperatura, mientras que las bandas ion carbonato ($875, 1413, 1449 \text{ cm}^{-1}$) presentan una disminución en su intensidad hasta desaparecer en temperaturas de $740 \text{ }^\circ\text{C}$, cuya causa es la formación y liberación de CO_2 en altas temperaturas y en un medio oxidante (aire), fenómeno previamente observado en TGA como una leve pérdida de masa en este rango de temperatura. En el caso de la banda 3573 cm^{-1} que corresponde a la vibración de iones hidroxilos (OH^-), se hace más visible conforme aumenta la temperatura de incineración, en consecuencia, a un efecto de concentración en el reordenamiento de la bio-Hap provocado por el proceso de incineración [35], [37].

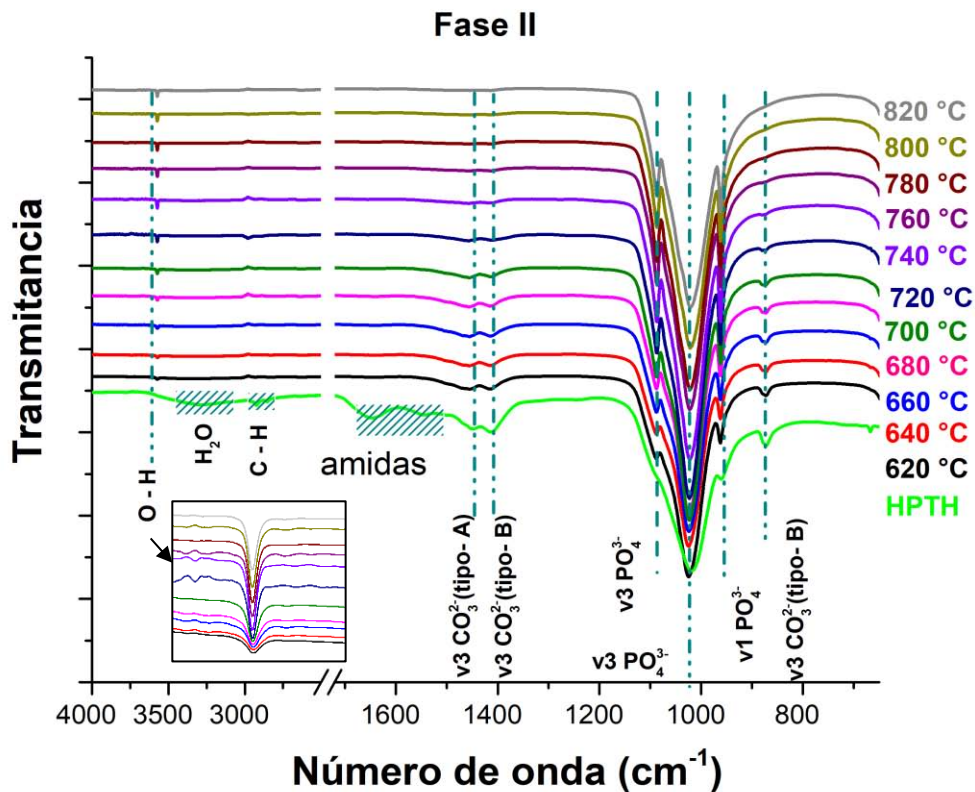


Figura 29 Espectros IR de las muestras obtenidas de la Fase II, HPTH y de $620 \text{ }^\circ\text{C}$ a $820 \text{ }^\circ\text{C}$

4.4 Identificación de fases cristalinas por DRX

Se verificó la fase cristalina de la muestra HPTH, visto en el patrón de difracción de la Figura 30, con la ayuda del PDF #09-0432 mediante la identificación de los picos de mayor intensidad vistos en los planos (002), (211), (310), (222) y (213) ubicados en los ángulos 2θ : 25.78, 31.94, 39.87, 46.74 y 49.49 respectivamente. La forma de patrón de difracción muestra una señal ruidosa que generalmente es atribuida al background de la fase orgánica, no obstante, también puede ser atribuido a un efecto de fluorescencia y dispersión (scattering) dado por el tamaño de granos de la bio-Hap, visto en las micrografías presentadas en los siguientes apartados.

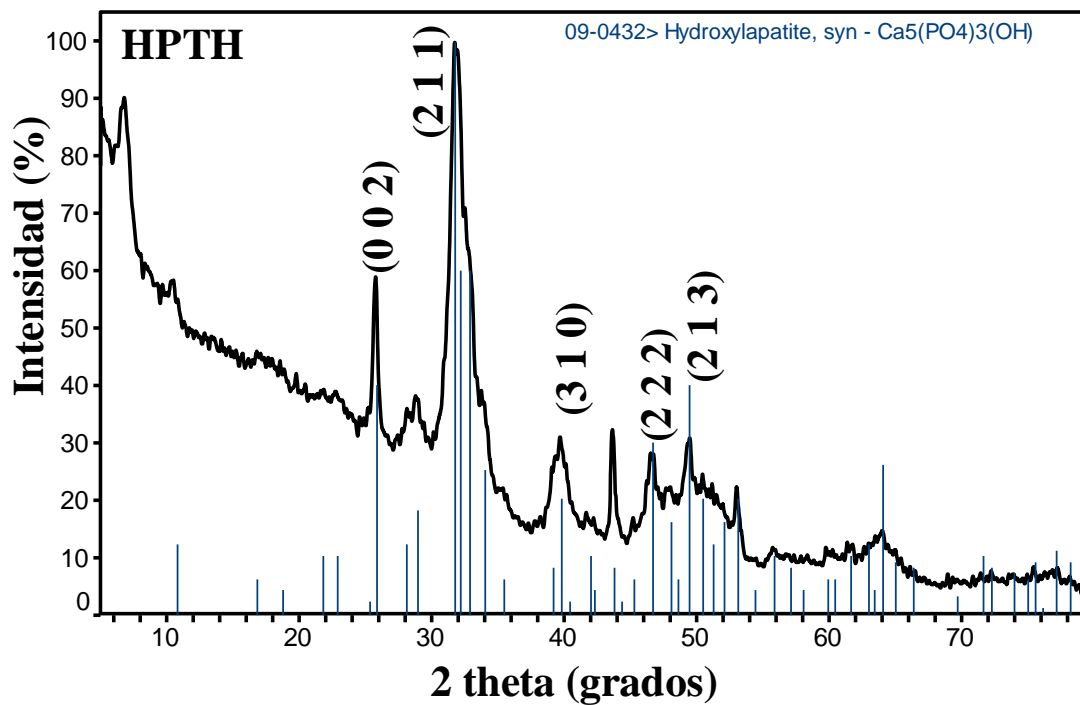


Figura 30 Difractograma de la muestra HPTH, identificación de fase cristalina con el PDF # 09-0432

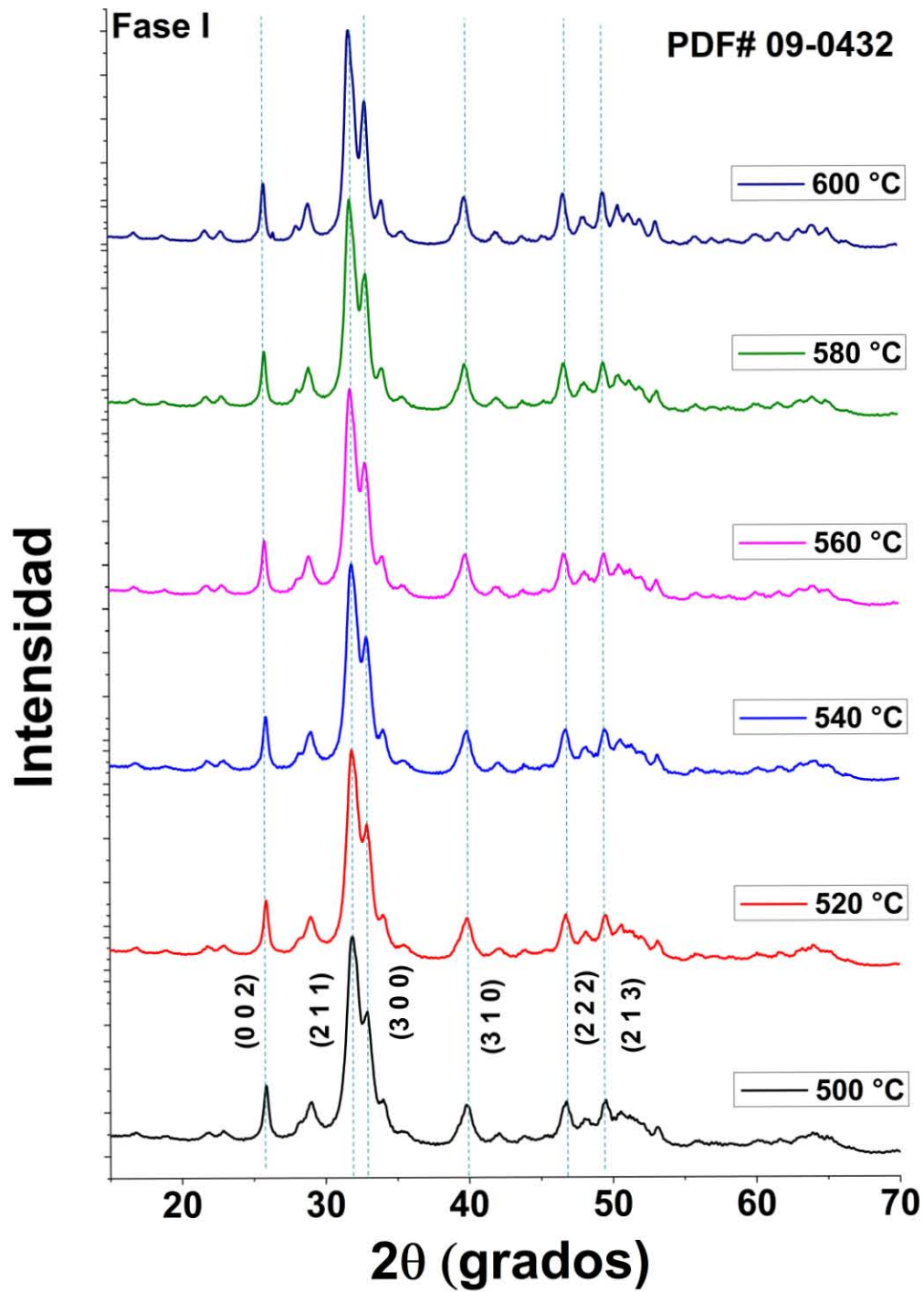


Figura 31 Difractograma de las muestras de la Fase I, 500 a 600 °C

En la Figura 31 se muestran los difractogramas del análisis por DRX de las muestras obtenidas en la Fase I. Se identificaron los picos de mayor intensidad con ayuda del PDF# 09-0432 que corresponde a la Hap sintética; los picos de mayor intensidad se encuentran en los planos (002), (211), (300), (310) (222) y (213) ubicados en los ángulos 2θ : 25.86, 31.8, 39.84, 46.7 y 49.5 respectivamente. De igual manera, en los patrones de difracción visto en función del aumento de la temperatura de incineración de 500 °C a 600 °C, se aprecia que los picos cada vez se van definiendo con mayor claridad como es el caso del plano (300) junto al plano (211). No se encontró presencia de otras fases cristalinas mayoritarias, sin embargo, es importante recordar que esta técnica permite la identificación de otras fases cristalinas en concentraciones mayores al 1 o el 2 %, por lo que no se puede asegurar la ausencia de otras fases cristalinas.

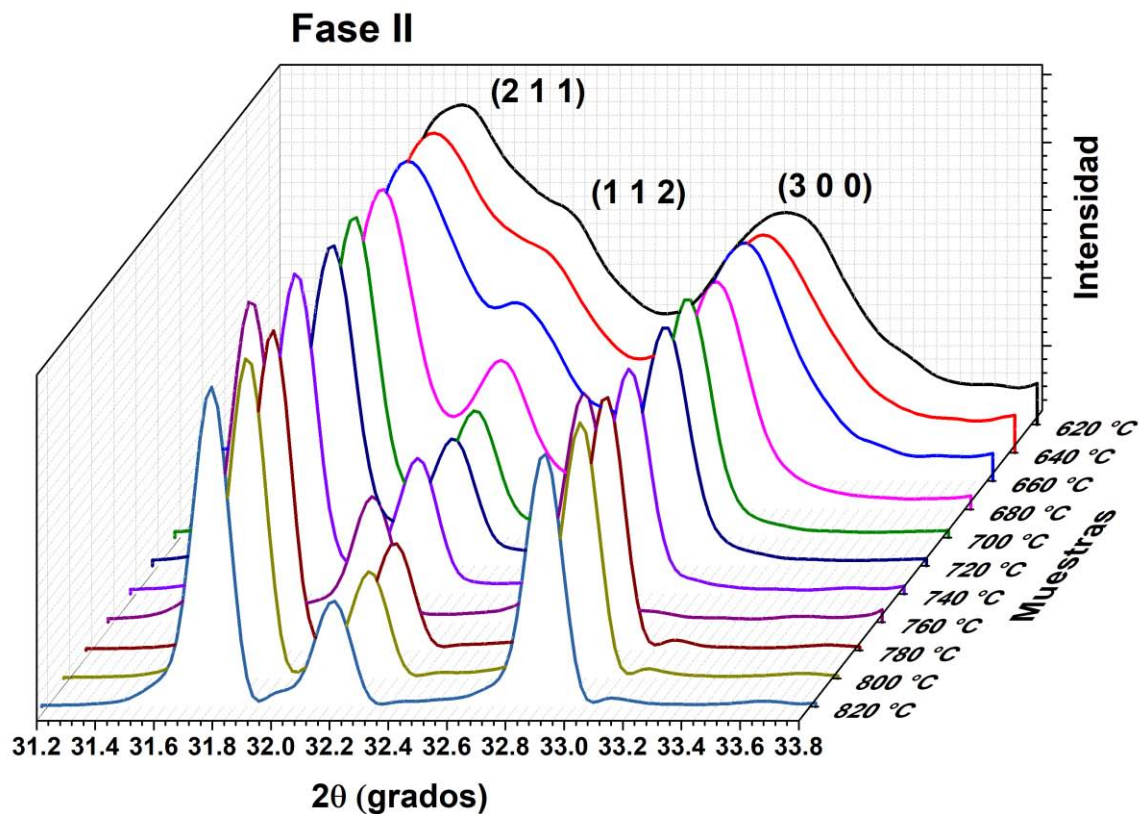


Figura 32 Difractograma de las muestras de la Fase II, visto los planos (211), (112) y (300).

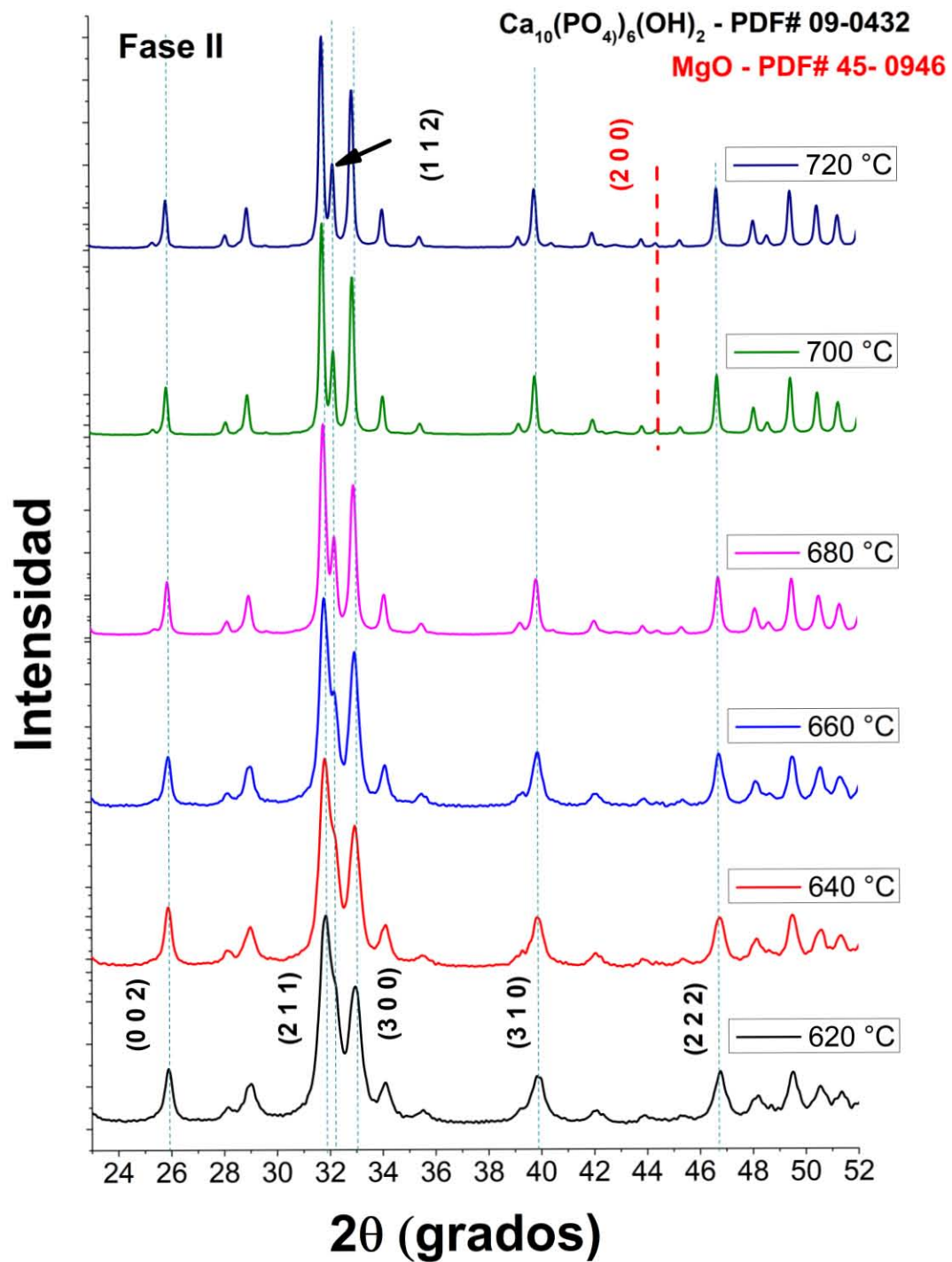


Figura 33 Difractograma de las muestras de la Fase II, de 620 a 720 °C

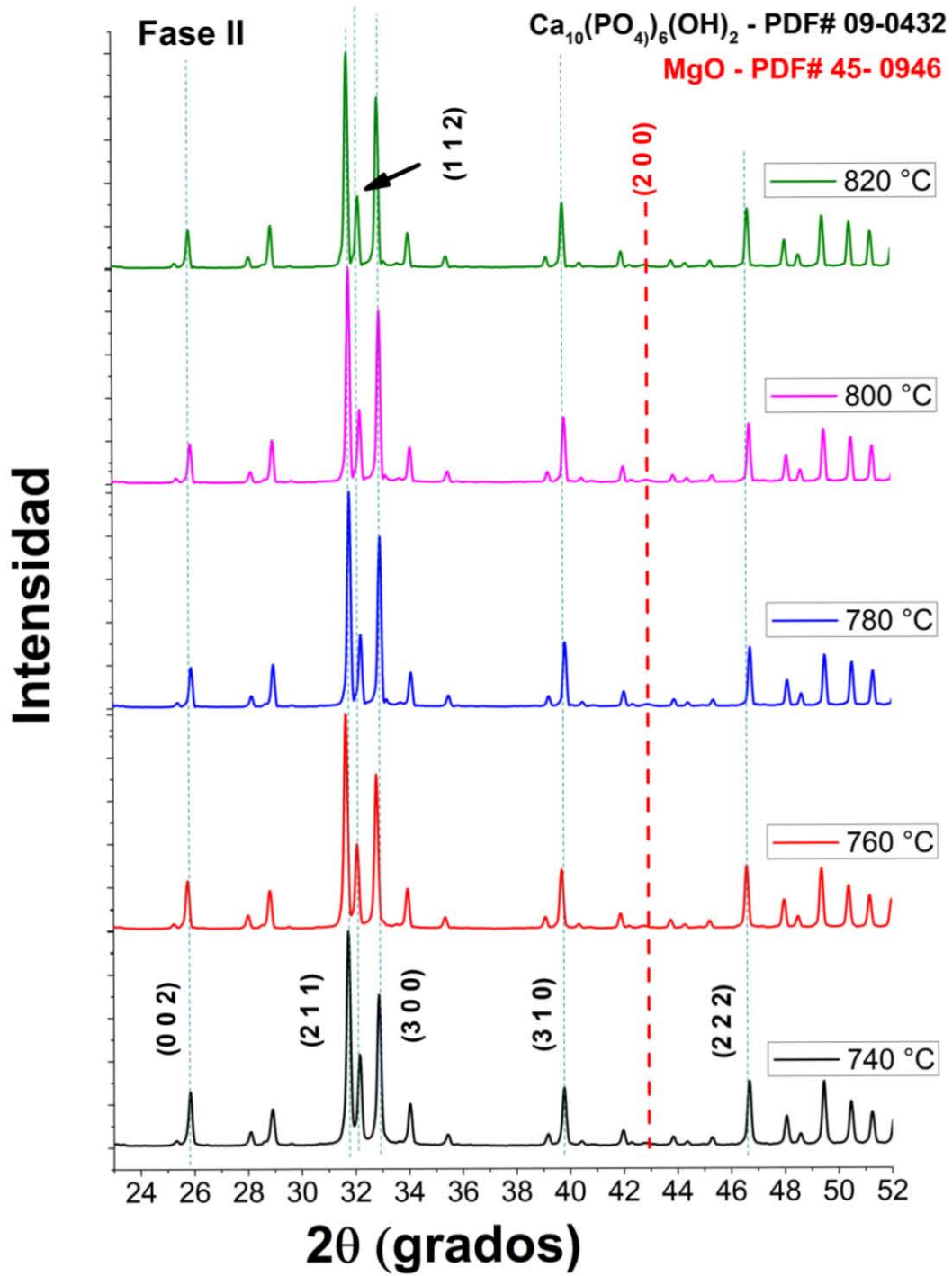


Figura 34 Difractograma de las muestras de la Fase II, de 740 a 820 °C

Los patrones de difracción de las muestras de la Fase II se encuentran en la Figura 33 y Figura 34. Para la identificación de fase cristalina se hizo uso del PDF# 09-0432 que corresponde a la Hap sintética, encontrando los picos de mayor intensidad en los planos (002), (211), (300), (310) y (222) ubicados en los ángulos 2θ : 25.84, 31.76, 32.9, 39.78 y 46.78 respectivamente. Se observa que a 680 °C el pico que corresponde al plano (112) en el ángulo 2θ 31.18° se empieza definir hasta ser evidentes a 820 °C (Figura 32). Esto mismo sucede con otros picos; en 700 °C se empieza a notar un leve pico en el ángulo 2θ de 41.9° que corresponde al plano (200) de mayor intensidad del óxido de magnesio (MgO) identificado con el PDF# 45-0946. En las micrografías que se muestran más adelante, la presencia de MgO es observada, sin embargo, por la intensidad del pico se puede decir que este óxido se encuentra en concentraciones bajas y, a pesar de no encontrarse la presencia de otras fases cristalinas en el material, no se puede garantizar la ausencia de éstas debido al límite de detección de la técnica.

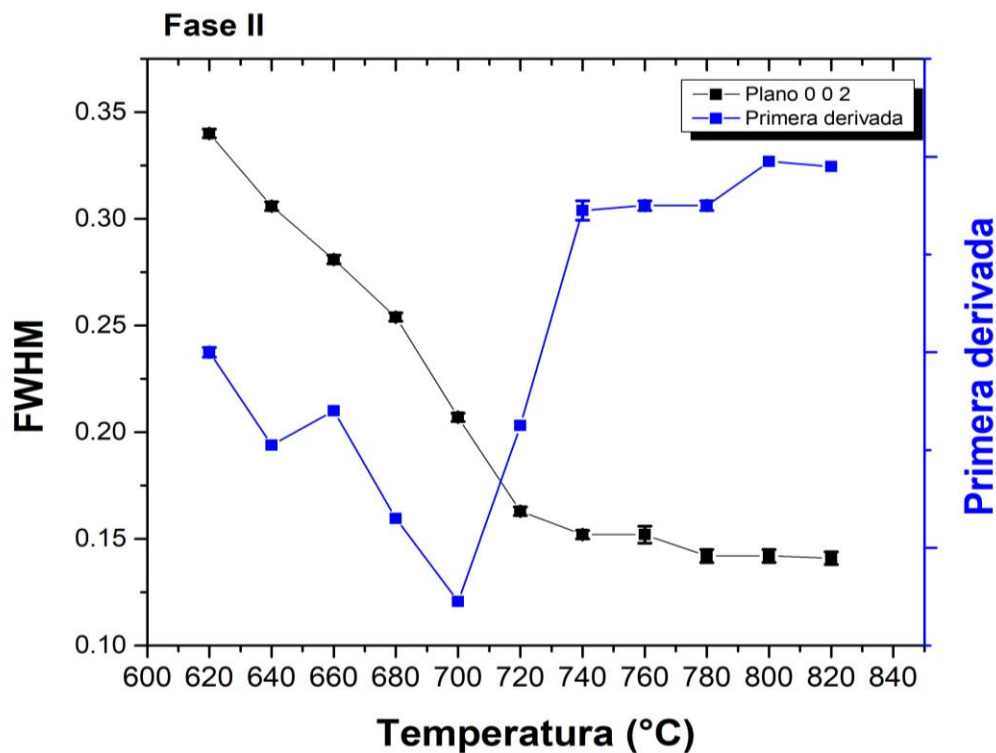


Figura 35 Cálculo del FWHM del plano (0 0 2), muestras de la Fase II, 620 a 820 °C

Los cambios de cristalinidad fueron establecidos con el ancho a la altura media del pico (FWHM), pues este parámetro es inversamente proporcional al tamaño cristalino promedio de acuerdo con la ecuación de Scherrer [9]. Se decidió realizar el cálculo FWHM, mediante el uso de software MDIJ Jade 6.0, del plano (002) ya que no se encuentra traslapado con otros picos a diferencia del pico de mayor intensidad (211) que se encuentra superpuesto con otros picos tales como es el (112) y el (300), observado en la Figura 32. En la Figura 35 se observa la disminución del FWHM en relación con el aumento de temperatura, que es asociado a un aumento al tamaño promedio del dominio cristalino. Mediante el cálculo de la primera derivada del FWHM (herramienta matemática sensible el cambio), se observan dos mínimos a temperatura de 640 y 700 °C, regiones de temperaturas que pueden estar asociados a cambios microestructurales de los cristales, como es la coalescencia de los granos de Hap, sin embargo, es necesario hacer un estudio más profundo para comprobar lo anteriormente mencionado.

4.5 Caracterización composicional por ICP-OES

El análisis por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES por sus siglas en inglés) permitió determinar la composición cuantitativa de las trazas de los elementos presentes en el polvo de hueso de porcino (HP), polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico (HPTH) y las muestras de bio-Hap incineradas a temperaturas de 600, 700 y 800 °C, que se muestran en la Tabla 4. En mayor proporción se encuentra los elementos característicos de la Hap que es Ca y el P, posteriormente se encuentran trazas de otros elementos particulares de la Hap natural en mediana y baja concentración como es el Na, Mg, K, Fe, Al y Zn. La presencia de los otros elementos tales como es el S, Si y Mn es debido al remanente de la combustión o de la digestión ácida de las proteínas presentes en la fase orgánica [14].

Tabla 4 Composición química elemental del polvo de hueso de porcino (HP), polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico (HPTH), y bio-Hap obtenido a 600, 700 y 800 °C

Trazas (ppm)	HP	HPTH	Hap 600	Hap 700	Hap 800
Ca	190482.548	212095.131	261695.396	264699.346	279242.983
P	111331.873	125651.092	164547.425	168264.539	175979.026
Na	4525.72553	4179.22801	5599.85642	5931.37678	5856.68333
Mg	3575.95805	4087.95153	5401.26945	5622.03754	5791.36379
K	757.08757	152.29384	180.71838	213.47428	176.83507
S	747.51917	580.79786	398.4036	467.20249	391.16285
Fe	25.64251	50.53392	157.60138	111.86291	52.29452
Al	7.9624	31.29484	182.50505	112.76506	12.69847
Zn	153.86041	168.54046	218.86417	227.17566	236.97785
Si	28.24602	33.18814	49.94256	73.35692	99.74295
Mn	0.40068	0.79979	1.91136	1.55021	1.34993
Ca/P- r.m.	1.32225	1.30449	1.22909	1.21573	1.22631

En la literatura se ha reportado que la Hap sintética posee una relación molar de Ca/P de 1.67, ya que es un compuesto estequiométrico [41], sin embargo, en nuestro material la

presencia de los elementos tales como el Na, Mg, K y Fe pueden remplazar a los iones Ca^{2+} en la estructura cristalina de la Hap confiriéndole la cualidad de ser un compuesto no estequiométrico [5]. La cualidad antes mencionada explica la relación molar Ca/P entre 1.21 y 1.32 de las diferentes muestras de polvo de hueso y de bio-Hap, como se observa en la Figura 36, en la cual la relación Ca/P disminuye levemente posterior al proceso de incineración, producto de la baja concentración y pérdida de átomos de Ca posiblemente al ser sustituido por otras trazas minerales presentes en el material, favorecido por las altas temperaturas de incineración. La existencia de otros elementos sustitucionales en la bio-Hap es benéfico puesto que es un factor que facilita la osteointegración del material con el tejido circundante, además de permitir que sea semejante al hueso humano.

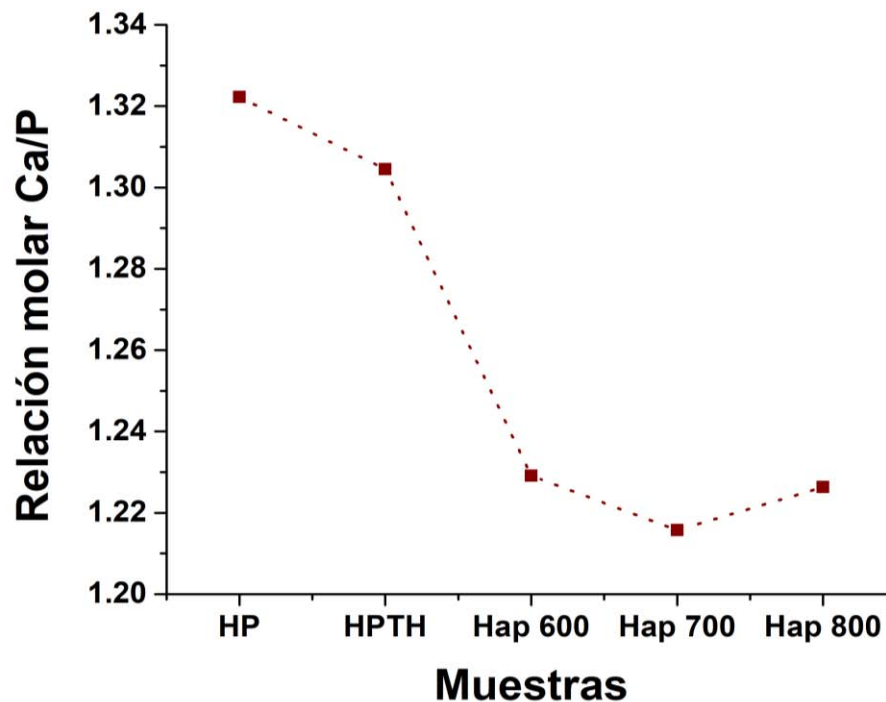


Figura 36 Relación molar Ca/P del polvo de hueso de porcino (HP), polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico (HPTH), y bio-Hap incinerada a 600, 700 y 800 °C

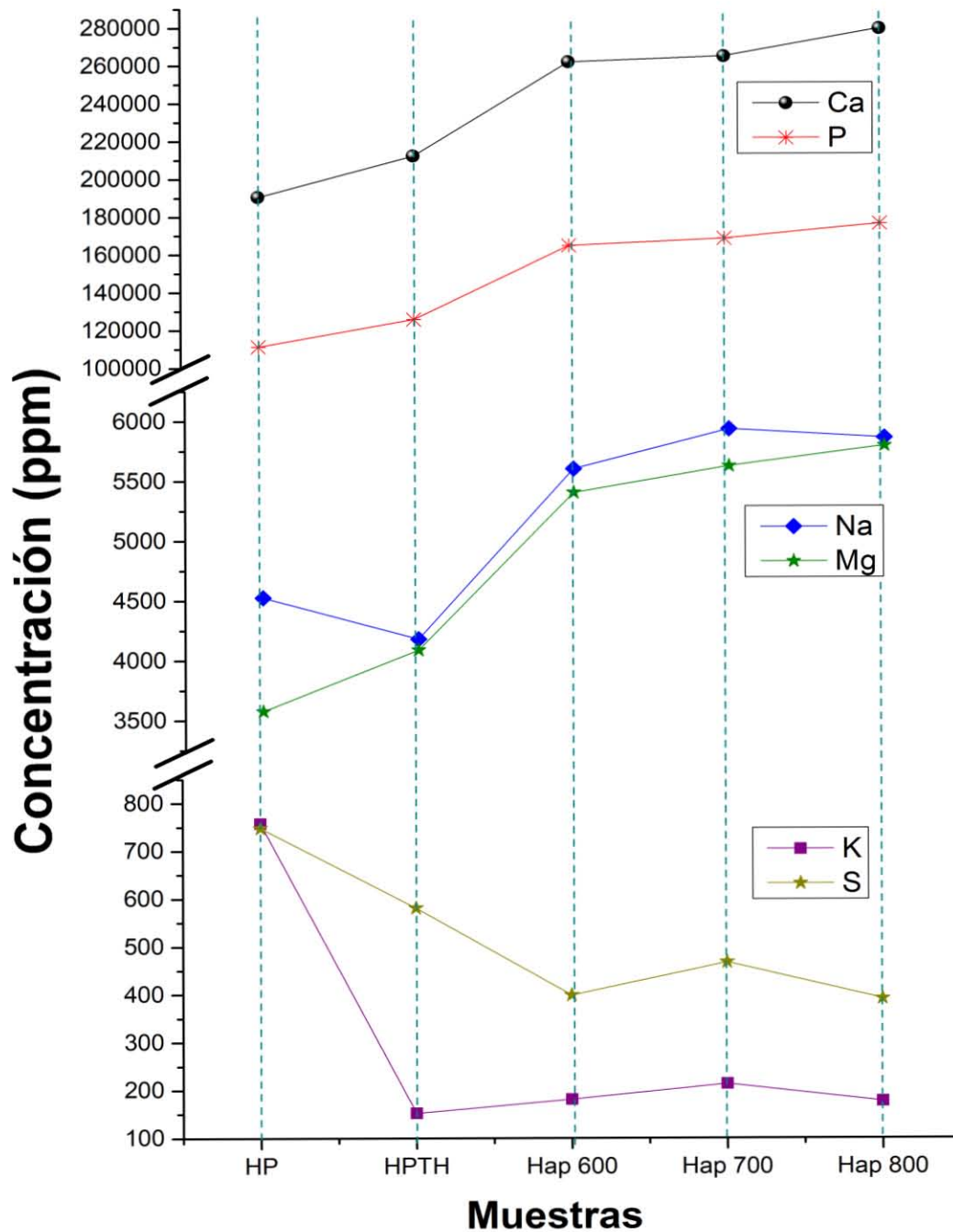


Figura 37 Composición química elemental en partes por millón del polvo de hueso de porcino (HP), polvo de hueso de porcino con tratamiento hidrotérmico (HPTH), y bio-Hap incinerada a 600, 700 y 800 °C

Mediante esta técnica se puede verificar que el tratamiento hidrotérmico realizado al polvo de hueso de porcino (HP y HPTH) no provocó una variación significativa en los elementos de mayor concentración que son el Ca, P, Na, Mg y S a excepción del K en el que se observa una reducción en la concentración, producto de la limpieza del polvo de hueso con el tratamiento hidrotérmico. Se observa con mayor claridad en la Figura 37.

Las trazas minerales del Ca, P, Na y Mg de las muestras incineradas a 600, 700 y 800 °C presentan una mayor concentración mineral en relación con el HP y HPTH, resultado del tratamiento térmico al que fue sometido generando la degradación de la fase orgánica, como se observa en la Figura 37. En el caso de las trazas minerales de K y S sufrieron una pérdida de esta fase mineral generado por el mismo tratamiento térmico.

4.6 Microestructura Superficial por SEM

Las micrografías superficiales de las muestras de la Fase I se presentan en la Figura 38, imágenes obtenidas con una amplificación de x100k y usando como señal los electrones secundarios (SE) en conjunto con los electrones retrodispersados (BSE). Como primera observación, en ninguna micrografía de las muestras se encuentra la presencia de materia orgánica superficial que generalmente es visto como fibrillas de colágeno; en consideración a los resultados por espectroscopia por IR y el análisis térmico por TGA/DSC, se puede suponer que este rango de temperatura de incineración con un tiempo de sinterización de 12 horas demuestran ser condiciones térmicas suficientes para que se lleve a cabo la degradación de la fase orgánica, aunque es posible que no sea suficiente para la transformación del carbono (producto de la combustión de la fase orgánica) en dióxido de carbono para la evaporación del mismo pues, conforme a la observación visual de las muestras (Figura 25), se tienen diferentes tonalidades de gris indicador de presencia de carbono.

Las micrografías también muestran pequeños granos de bio-Hap con una morfología no definida y entrelazada entre sí, formando una especie de red con huecos, posiblemente producto del desprendimiento y la degradación de la fase orgánica. En la micrografía de la muestra incinerada a 500 °C, analizado con el programa de ImageJ, se midieron los granulos de bio-Hap con un tamaño entre 30 y 80 nm de largo; al ir aumentando la temperatura de incineración hasta llegar los 600 °C los granulos de bio-Hap mostraron un leve crecimiento con tamaños entre 40 y 100 nm de largo, aún entrelazados y sin morfología definida.

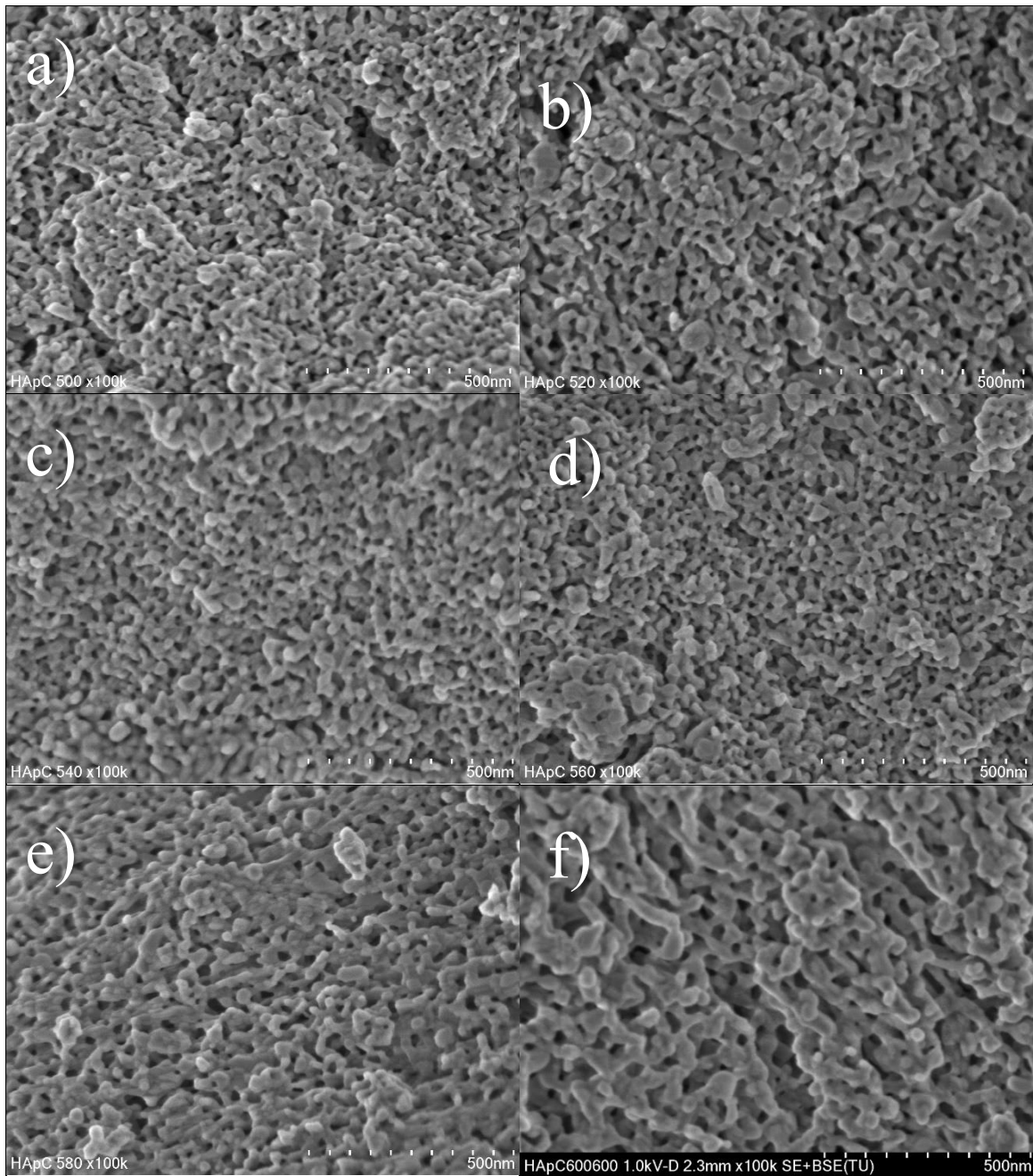


Figura 38 Micrografía de las muestras de la Fase I a una amplificación de x100K. a) 500 °C, b) 520 °C, c) 540 °C, d) 560 °C, e) 580 °C y f) 600 °C

Las micrografías superficiales de las muestras de la fase II se encuentran en la Figura 39 y Figura 40. Las imágenes también fueron obtenidas usando como señal electrones secundarios (SE) en conjunto con electrones retrodispersados (BSE) a una amplificación de $\times 100k$. Los gránulos de bio-Hap a $620\text{ }^{\circ}\text{C}$ presentan una morfología en forma de barras no completamente definidas entrelazadas entre sí y, analizando con el programa ImageJ, se observan tamaños de granos entre 60 a 100 nm de largo; al ir aumentando la temperatura de incineración se percibe un crecimiento de hasta 700 nm visto en temperaturas de $820\text{ }^{\circ}\text{C}$, observación que está correlacionada con la disminución del FWHM de las mismas muestras.

Este crecimiento de los granos es observado de igual manera en la disminución del FWHM de las muestras de la Fase II en el plano (002), indicador del aumento de la calidad cristalina del material (ver Figura 35), y con el cálculo de la primera derivada (usado como una función matemática sensible al cambio) se observan dos mínimos en temperaturas de 640 y $700\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperaturas que pueden ser asociados a temperatura de activación para el crecimiento y coalescencia de los gránulos de bio-Hap, observándose en el mismo rango de temperatura en el DSC como un evento endotérmico en consecuente a una transición de fase en el material.

La micrografía de la muestra obtenida a temperatura de $720\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observa la estructura morfológica no definida de un prisma hexagonal con tamaños de gránulos entre 100 y 200 nm de largo (Figura 39-f), ésta morfología continúa hasta llegar a temperaturas de $820\text{ }^{\circ}\text{C}$ formando granos de bio-Hap con tamaños entre 200 a 700 nm de largo (Figura 40- e,f), esto puede ser debido a que es una morfología de cristal termodinámicamente estable.

En las micrografías de las muestras incineradas a 760, 800 y $820\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observa la presencia de otra fase cristalina en la superficie de los gránulos de bio-Hap (Figura 40-b, d, e) que puede ser asociada a la formación de óxido de magnesio (MgO) ya reportado en la literatura [12]. La existencia de MgO en el material fue encontrada en los difractograma desde la muestra incinerada a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 34); se observa tenuemente el pico de mayor intensidad en el ángulo 2θ de 41.9° que corresponde al plano (200) de mayor intensidad del MgO usando el PDF# 45-0946.

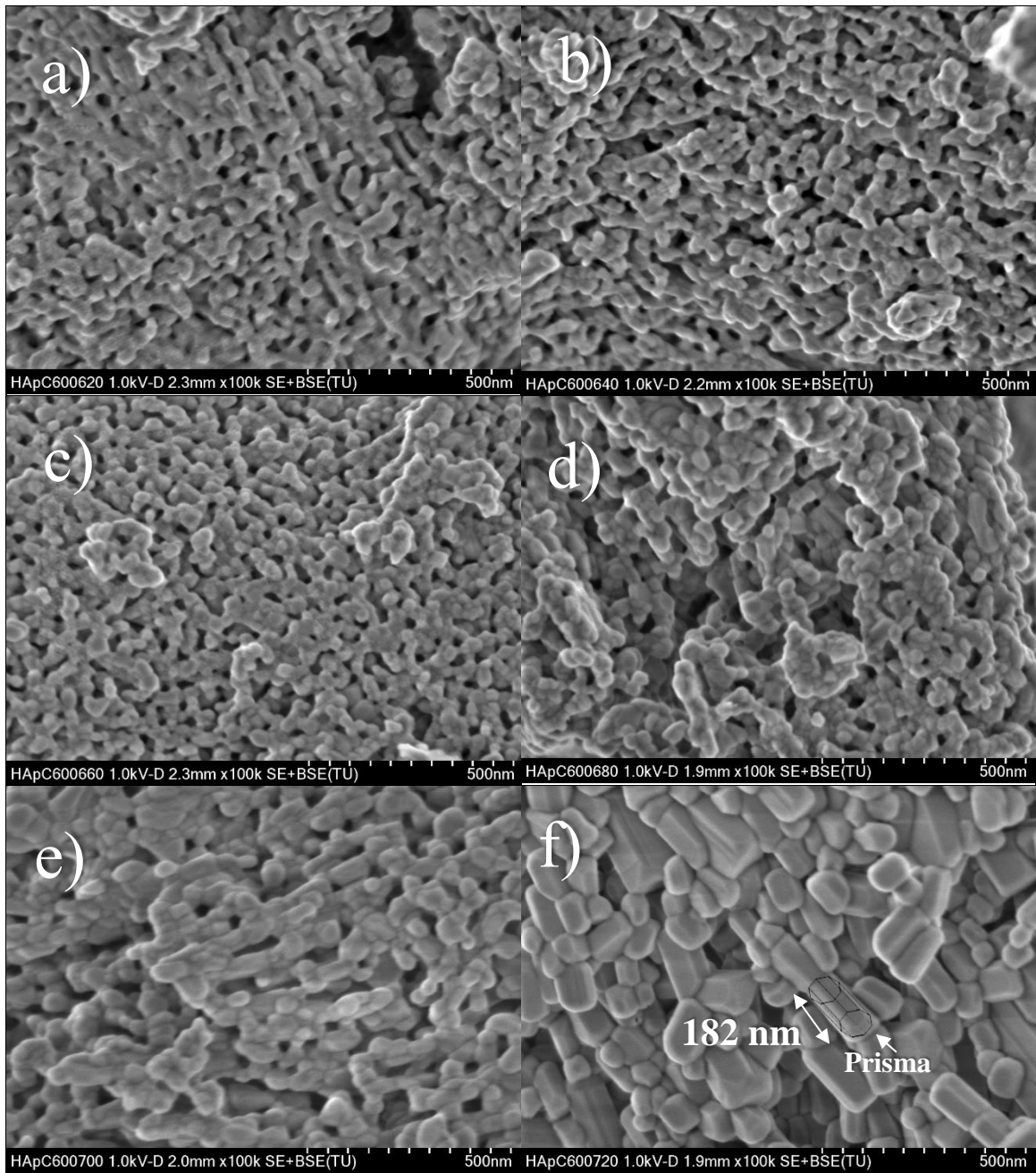


Figura 39 Micrografía de las muestras de la Fase II a una ampliación de $\times 100K$. a) 620 °C, b) 640 °C, c) 660 °C, d) 680 °C, e) 700 °C y f) 720 °C

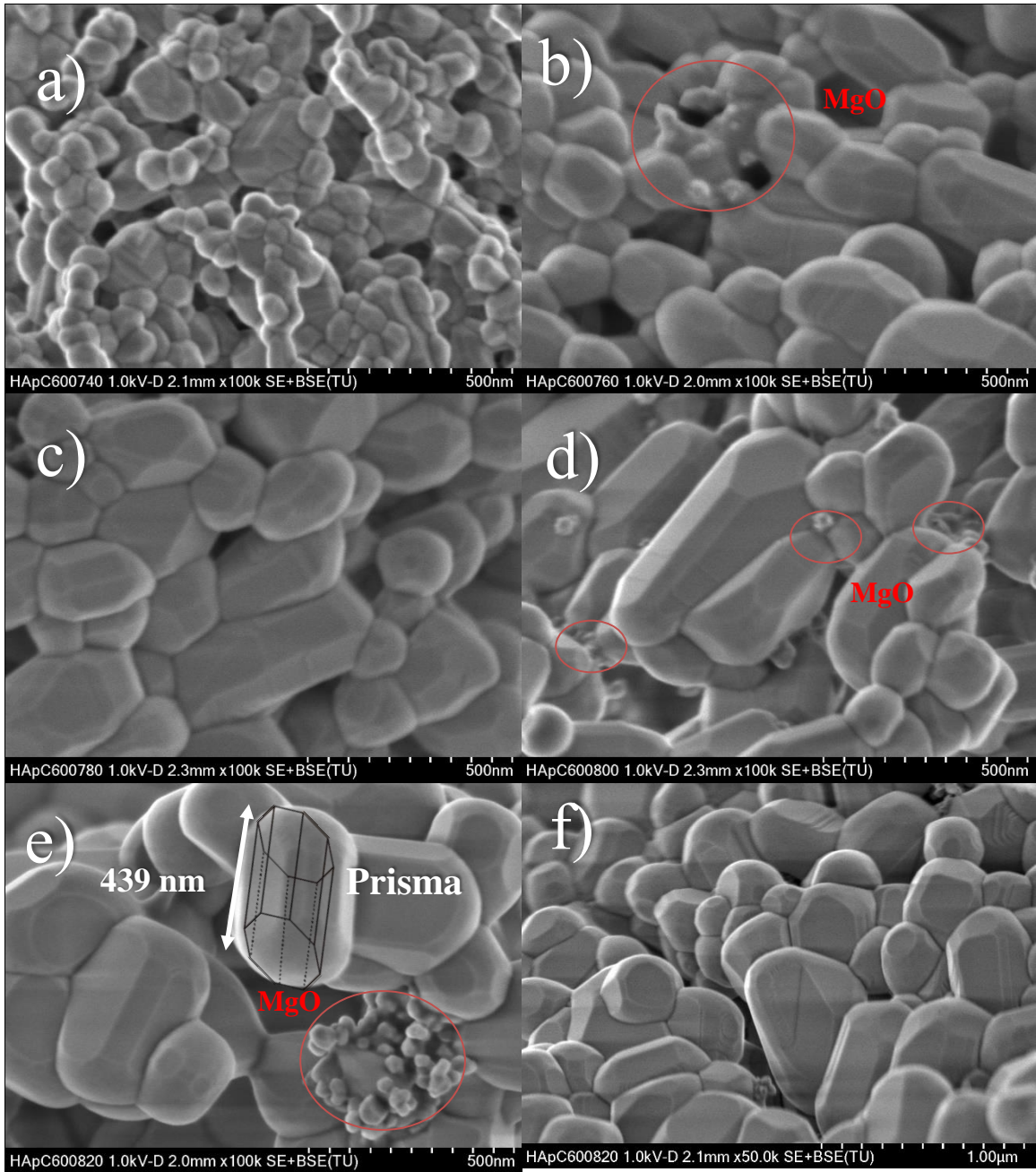


Figura 40 Micrografía de las muestras de la Fase II a una amplificación de x100K. a) 740 °C, b) 760 °C, c) 780 °C, d) 800 °C, e) 820 °C y f) 820 °C a una amplificación de x50k

CONCLUSIONES

- ✚ El análisis térmico por TGA/DSC de polvo de hueso de fémur de porcino pretratado, sometido a una rampa de calentamiento de 25 a 1100 °C con una velocidad de 5 °C/min, permitió identificar una región de estudio de interés entre 500 a 840 °C, región donde los eventos térmicos ocurridos pueden ser asociados a cambios microestructurales del material. Y, junto con la revisión bibliográfica, se logró establecer un diseño experimental dividido en dos fases. La Fase I de 500 a 600 °C con muestreo cada 20 °C, muestras donde se evaluó la remoción de la fase orgánica y los cambios microestructurales del material por diferentes técnicas de caracterización, y la Fase II de 620 a 820 °C con muestreo cada 20 °C, se estudió los cambios microestructurales y estructurales que sufrió el material usando diferentes técnicas de caracterización.
- ✚ Utilizando la metodología ya reportada por Ramírez-Gutiérrez et al. [32] para la obtención de polvo de hueso de porcino y con los parámetros térmicos de incineración establecidos en el diseño experimental de la Fase I y II, se logró obtener bio-Hap de porcino con diferentes condiciones de tratamiento de incineración, muestras que fueron estudiadas posteriormente por DRX, ICP, SEM y FTIR.
- ✚ Mediante el estudio por FTIR en configuración por ATR, no se encontró bandas de grupos funcionales que fueran asociadas a la fase orgánica de las muestras obtenidas en la Fase I y Fase II, permitiendo visualizar una remoción completa de los residuos orgánicos presentes en el material y determinando que las condiciones de tratamientos dados en la Fase I y Fase II son suficientes para la combustión y la remoción de la fase orgánica, resultado apoyados por el análisis por TGA/DSC. Sin embargo, los espectros IR de las muestras de la Fase II, mostraron la pérdida completa de los iones carbonatos a temperaturas de 740 °C, observado en el análisis térmico por TGA como una pérdida significativa de masa.

- ✚ El análisis por DRX y por SEM de las muestras de la Fase I (temperaturas de incineración de 500 a 600 °C con un tiempo de sinterización de 12 horas), permitieron estudiar los cambios microestructurales y morfológicos del material, siendo que las condiciones de tratamiento fueron suficientes para que la bio-Hap sufriera pequeños cambios morfológicos teniendo granos desde 30 nm hasta 100 nm, observaciones que aún no se han reportado en la literatura.

- ✚ De igual manera, el estudio por DRX y por SEM de las muestras de la Fase II (temperaturas de incineración de 620 a 820 °C), proporcionaron información de los cambios microestructurales y morfológicos del material. Donde el cálculo del FWHM del plano (0 0 2) muestra una disminución en función al incremento de la temperatura de incineración que es asociado a un aumento en el tamaño promedio del dominio cristalino, esto a su vez se correlaciona con el incremento del tamaño de grano obtenidas por las micrografías por SEM de las mismas muestras.

- ✚ Con el estudio composicional por ICP se demostró la composición característica de la bio-Hap, encontrando la presencia de otras trazas minerales tales como Na, Mg, K, Fe, Al, S, Si y Mn en bajas concentraciones en relación con el Ca y el P. En el cálculo de la relación molar de Ca/P se obtuvo valores entre 1.21 y 1.32, sugiriéndonos la obtención de un material no estequiométrico debido por la presencia de trazas sustitucionales, sin embargo, la presencia de estas trazas minerales se le considera un valor agregado en comparación a la Hap sintética ya que esto de le confiere una mayor similitud al tejido óseo humano, lo que conlleva una mayor biocompatibilidad. También se demostró que la temperatura de incineración no afectó de manera significativa al contenido mineral de la bio-Hap.

- ✚ De acuerdo con los parámetros térmicos establecidos en el diseño experimental de la Fase I y II, se demuestra que se puede obtener bio-Hap con diferentes cualidades fisicoquímicas que son entendidas de acuerdo con los resultados de las diferentes técnicas de caracterización utilizadas, por lo cual se pueden proponer metodologías para la obtención de bio-Hap con características determinadas en relación con la aplicación deseada.

REFERENCIAS

- [1] M. V. García-Garduño and J. Reyes-Gasga, “La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica,” *Tip Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 9, no. 2, pp. 90–95, 2006.
- [2] S. J. Kalita, A. Bhardwaj, and H. A. Bhatt, “Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, no. 3, pp. 441–449, 2007.
- [3] R. Hernández T, R. Palma C, and C. Piña, “Hidroxiapatita y sus aplicaciones,” *Rev. Mex. Física*, vol. 45, pp. 144–147, 1999.
- [4] S. M. Londoño-Restrepo, “Estudio de la cinética de formación granular de Bio-Hap como función de la temperatura,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [5] S. V Dorozhkin and M. Epple, “Biological and medical significance of calcium phosphates,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 41, no. 17, pp. 3130–3146, 2002.
- [6] A. L. Giraldo-Betancur *et al.*, “Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite,” *Curr. Appl. Phys.*, vol. 13, no. 7, pp. 1383–1390, 2013.
- [7] A. Haider, S. Haider, S. S. Han, and I.-K. Kang, “Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 13, pp. 7442–7458, 2017.
- [8] X. Lu *et al.*, “Hexagonal hydroxyapatite formation on TiO₂ nanotubes under urea modulation,” *CrystEngComm*, vol. 13, no. 11, p. 3741, 2011.
- [9] S. M. Londoño-Restrepo, C. F. Ramirez-Gutierrez, A. Del Real-López, E. Rubio-Rosas, and M. E. Rodríguez-García, “Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air,” *Mater. Sci.*, vol. 51, pp. 4431–4441, 2016.
- [10] A. B. Martínez-Valencia, H. E. Esparza-Ponce, G. Carbajal-De La Torre, and J. Ortiz-Landeros, “Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis,” *Superf. y Vacío*, vol. 21, no. 4, pp. 18–21, 2008.
- [11] A. Martinelli, M. C. Novoa, C. Oldani, and A. Corominas, “Síntesis y caracterización de hidroxiapatita para implantes biomédicos.,” *XVIII Congr. Argentino Bioingeniería*, pp. 1–9, 2011.

-
- [12] C. F. Ramirez-Gutierrez, S. M. Londoño-Restrepo, A. del Real, M. A. Mondragón, and M. E. Rodriguez-García, “Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone,” *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 10, pp. 7552–7559, 2017.
- [13] M. H. Ross and W. Pawlina, *Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular*, Edición en. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2016.
- [14] K. S. Saladin and E. Gaudio, *Anatomía & fisiología*, 6ta ed. Georgia College & State University: Piccin, 2013.
- [15] N. Y. Mostafa and P. W. Brown, “Computer simulation of stoichiometric hydroxyapatite: Structure and substitutions,” *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 68, no. 3, pp. 431–437, 2007.
- [16] V. Uskokovic, “The Role of Hydroxyl Channel in Defining Selected Physicochemical Peculiarities Exhibited by Hydroxyapatite,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 46, pp. 36614–36633, 2015.
- [17] M. Corno, R. Orlando, B. Civalleri, and P. Ugliengo, “Periodic B3LYP study of hydroxyapatite (001) surface modelled by thin layer slabs,” *Eur. J. Mineral.*, vol. 19, no. 5, pp. 757–767, 2007.
- [18] E. M. Rivera-Muñoz, R. Velázquez, and J. L. Cabrera-Torres, “Morphological Analysis of Hydroxyapatite Particels Obtained by Different Methods,” *Mater. Sci. Forum*, vol. 638–642, pp. 681–686, 2010.
- [19] A. W. Coats and J. P. Redfern, “Thermogravimetric analysis. A review,” *Analyst*, vol. 88, no. 1053, pp. 906–924, 1963.
- [20] M. Guglielmi, G. Kickelbick, and A. Martucci, *Sol-Gel Nanocomposites*, Springer S. New York, USA, 2014.
- [21] P. Gabbott, *Principles and applications of thermal analysis*. John Wiley & Sons, 2008.
- [22] B. P. Squires, “Differential Scanning Calorimetry,” *Can. Med. Assoc. J.*, vol. 130, no. 5, p. 557, 1984.
- [23] K. V. Kodre, S. R. Attarde, Y. P. R., R. Y. Patil, and V. U. Barge, “Differential Scanning Calorimetry: A Review,” *Res. Rev. J. Pharm. Anal.*, vol. 3, no. 3, pp. 11–22, 2014.
- [24] P. Gabbott, “A Practical Introduction to Differential Scanning Calorimetry,” *Princ. Appl. Therm. Anal.*, pp. 1–50, 2008.

-
- [25] P. Patnaik and J. A. Dean, *Dean's analytical chemistry handbook*. McGraw-Hill, 2004.
- [26] H. G. Brittain and R. D. Bruce, "Chapter 4 Thermal analysis," *Compr. Anal. Chem.*, vol. 47, pp. 63–109, 2006.
- [27] M. Ferrari, L. Mottola, and V. Quaresima, "Infrared Spectroscopy," *Techniques*, pp. 463–488, 2004.
- [28] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, 6th ed. U.S.A.: Cengage learning, 2017.
- [29] X. Hou, R. S. Amais, B. T. Jones, and G. L. Donati, "Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry," *Encycl. Anal. Chem.*, 2006.
- [30] C. B. Boss and K. J. Fredeen, *Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, 2nd ed. U.S.A.: Perkin Elmer Norwalk, 1999.
- [31] P. Hawkes and J. C. H. Spence, *Science of microscopy*. Springer Science & Business Media, 2008.
- [32] C. F. Ramirez-Gutierrez, A. F. Palechor-Ocampo, S. M. Londoño-Restrepo, B. M. Millán-Malo, and M. E. Rodríguez-García, "Cooling rate effects on thermal, structural, and microstructural properties of bio-hydroxyapatite obtained from bovine bone," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 104, no. 2, pp. 339–344, 2016.
- [33] M. Figueiredo, A. Fernando, G. Martins, J. Freitas, F. Judas, and H. Figueiredo, "Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone," *Ceram. Int.*, vol. 36, no. 8, pp. 2383–2393, 2010.
- [34] A. Niakan *et al.*, "Sintering behaviour of natural porous hydroxyapatite derived from bovine bone bovine bone," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. April 2016, pp. 3024–3029, 2015.
- [35] E. A. Ofudje, A. Rajendran, A. I. Adeogun, M. A. Idowu, S. O. Kareem, and D. K. Pattanayak, "Synthesis of organic derived hydroxyapatite scaffold from pig bone waste for tissue engineering applications," *Adv. Powder Technol.*, vol. 29, pp. 2–9, 2017.
- [36] J. Trinkunaite-Felsen, Z. Stankeviciute, J. C. Yang, T. C. K. Yang, A. Beganskiene, and A. Kareiva, "Calcium hydroxyapatite/whitlockite obtained from dairy products: Simple, environmentally benign and green preparation technology," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 8 PART B, pp. 12717–12722, 2014.

-
- [37] A. M. Sofronia, R. Baies, E. M. Anghel, C. A. Marinescu, and S. Tanasescu, "Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 43, pp. 153–163, 2014.
- [38] M. E. Bahrololoom, M. Javidi, S. Javadpour, and J. Ma, "Characterisation of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash," *J. Ceram. Process. Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 129–138, 2009.
- [39] M. J. Lukić, M. Sezen, Đ. Veljović, and A. Mraković, "A facile route for hydroxyapatite densification with an increased heating rate," *Mater. Lett.*, vol. 207, pp. 12–15, 2017.
- [40] X. Y. Lü, Y. Bin Fan, D. Gu, and W. Cui, "Preparation and Characterization of Natural Hydroxyapatite from Animal Hard Tissues," *Key Eng. Mater.*, vol. 342–343, pp. 213–216, 2007.
- [41] Lim, T. Ki, and J. Kim, "Development and Evaluation of Natural Hydroxyapatite Ceramics Produced by the Heat Treatment of Pig Bones," *Biosyst. Eng.*, vol. 39, no. 3, pp. 227–234, 2014.

APÉNDICE

• Patrones de difracción de las muestras de la Fase I

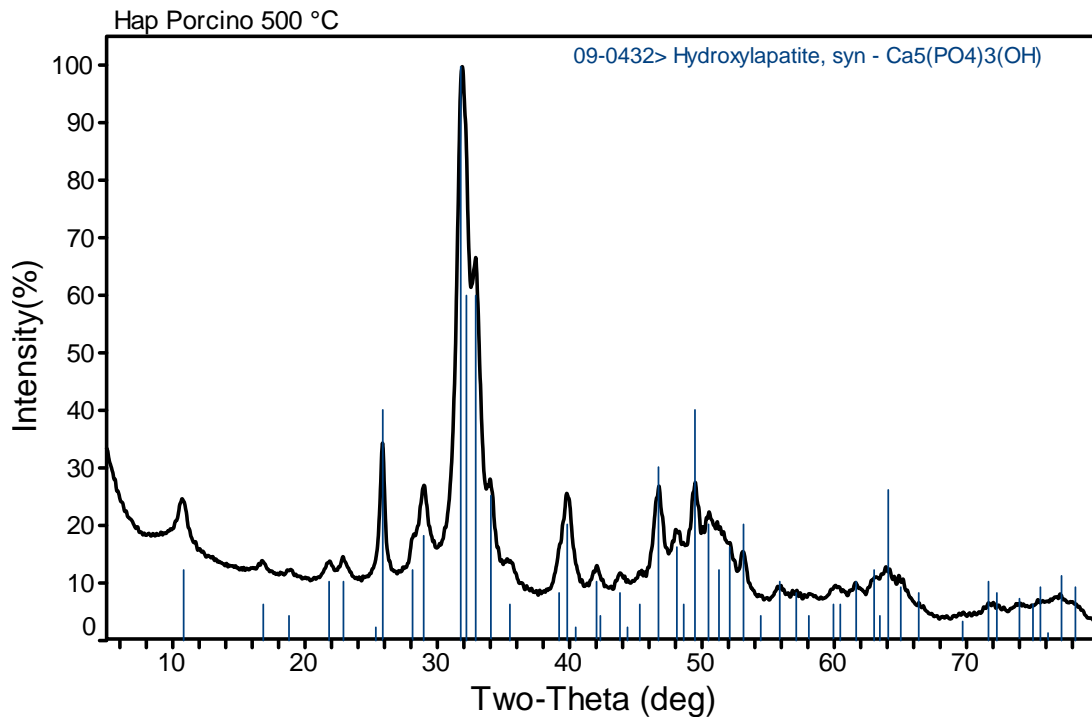


Figura 41 Difractograma de bio-Hap a 500 °C por 12 horas a 5 °C/min

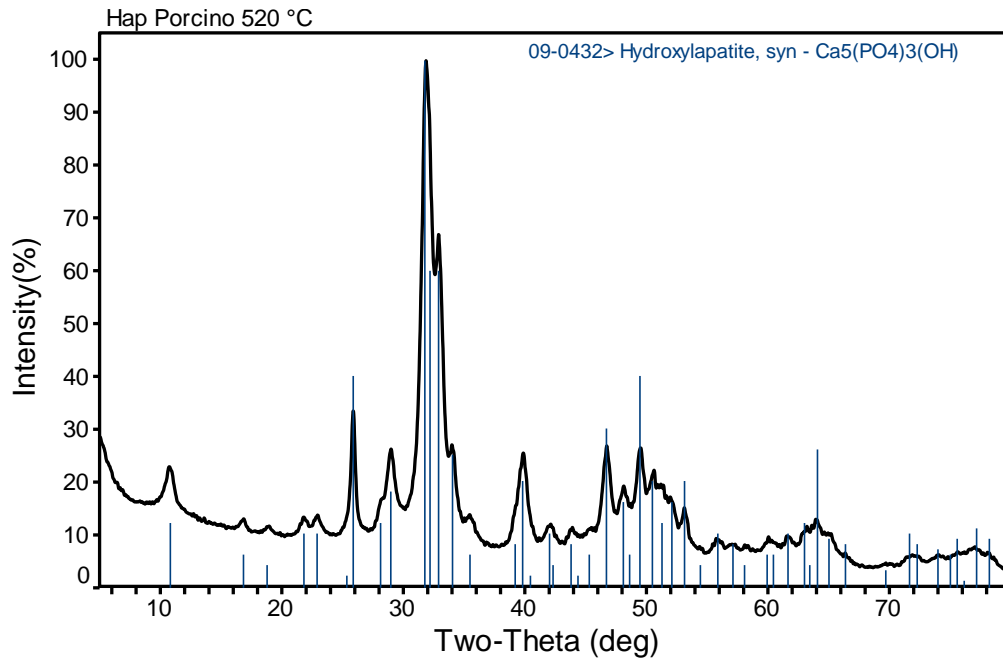


Figura 42 Difractograma de bio-Hap a 520 °C por 12 horas a 5 °C/min

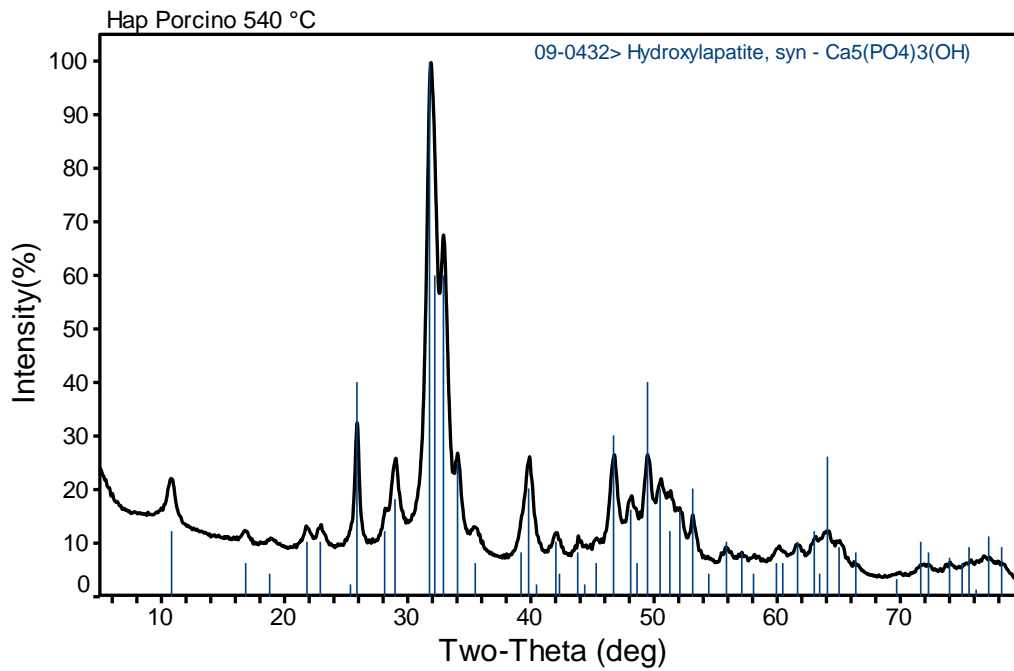


Figura 43 Difractograma de bio-Hap a 540 °C por 12 horas a 5 °C/min

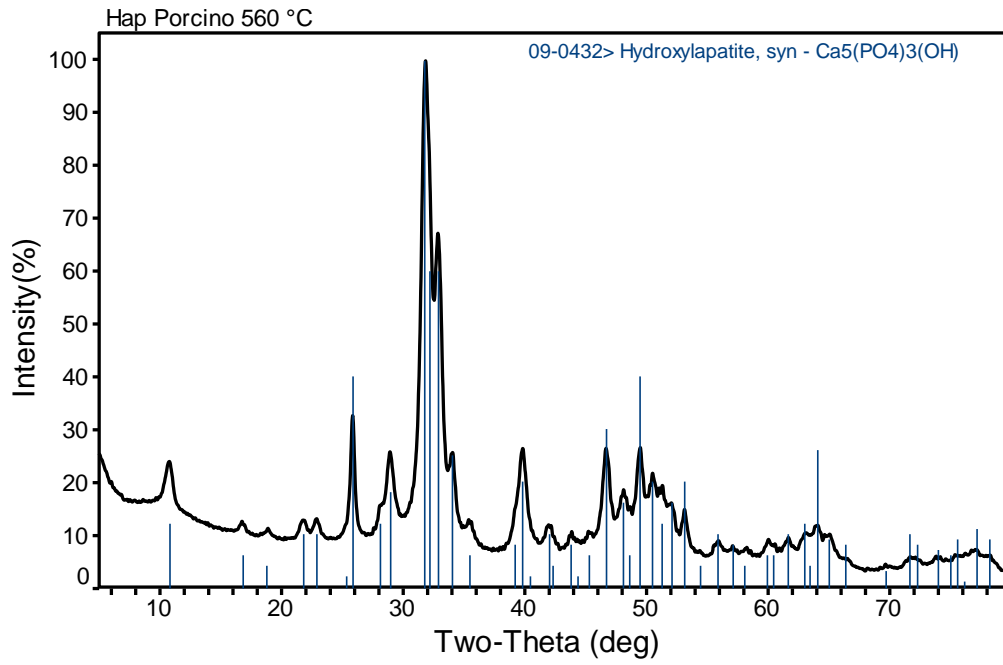


Figura 44 Difractograma de bio-Hap a 560 °C por 12 horas a 5 °C/min

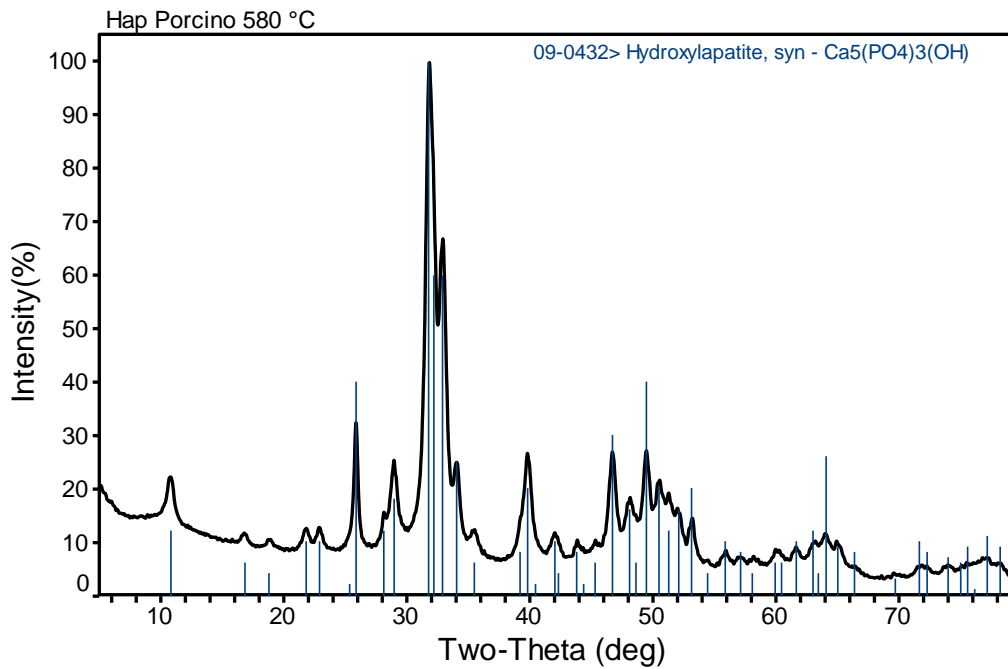


Figura 45 Difractograma de bio-Hap a 580 °C por 12 horas a 5 °C/min

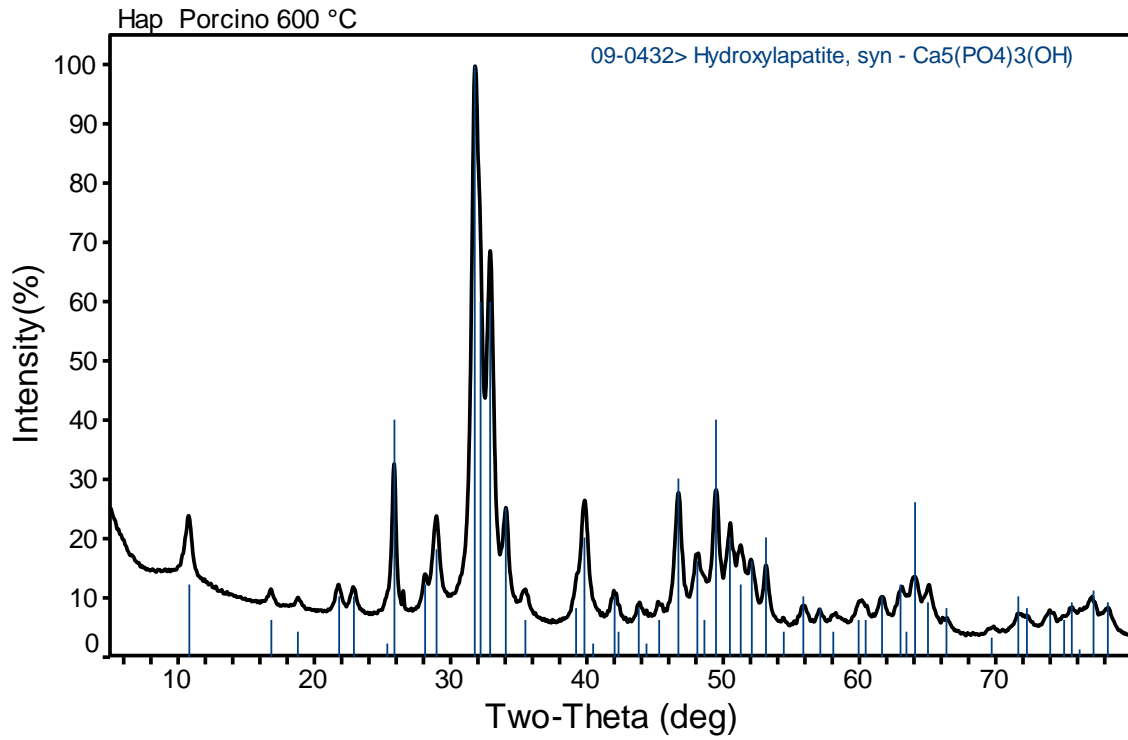


Figura 46 Difractograma de bio-Hap a 600 °C por 12 horas a 5 °C/min

- **Patrones de difracción de las muestras de la Fase II**

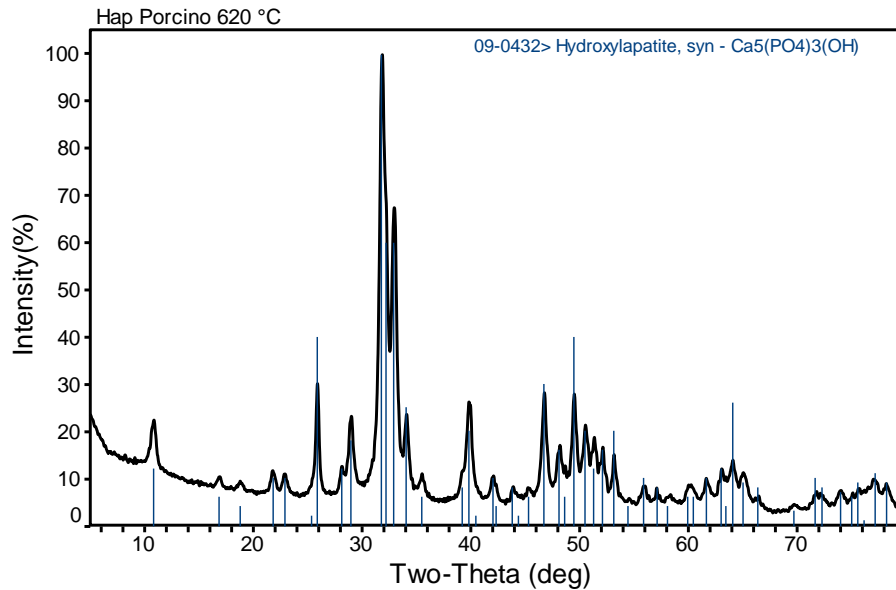


Figura 47 Difractograma de bio-Hap a 620 °C por 3 horas a 5 °C/min

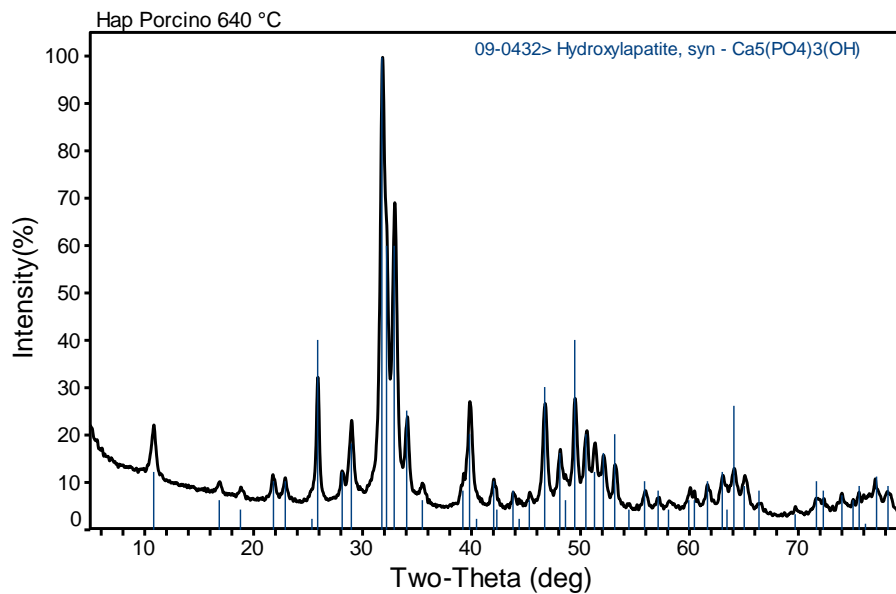


Figura 48 Difractograma de bio-Hap a 640 °C por 3 horas a 5 °C/min

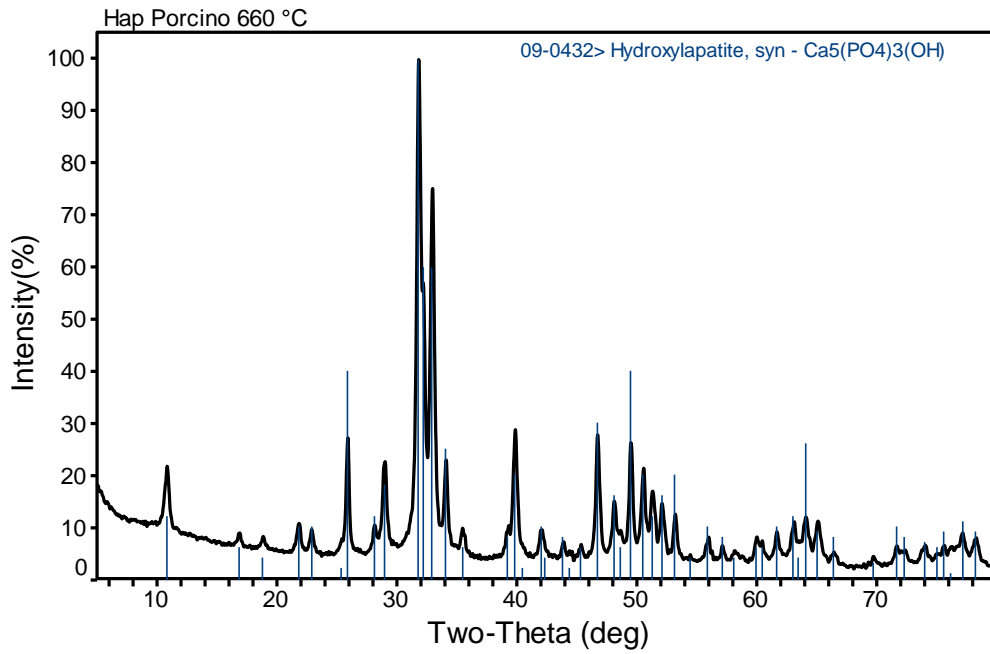


Figura 49 Difractograma de bio-Hap a 660 °C por 3 horas a 5 °C/min

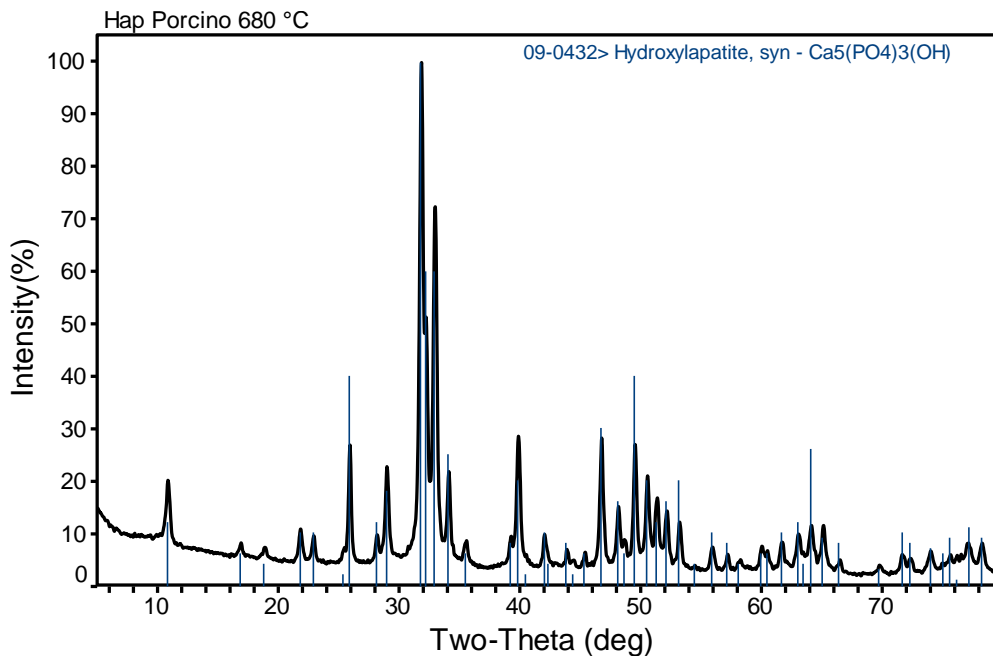


Figura 50 Difractograma de bio-Hap a 680 °C por 3 horas a 5 °C/min

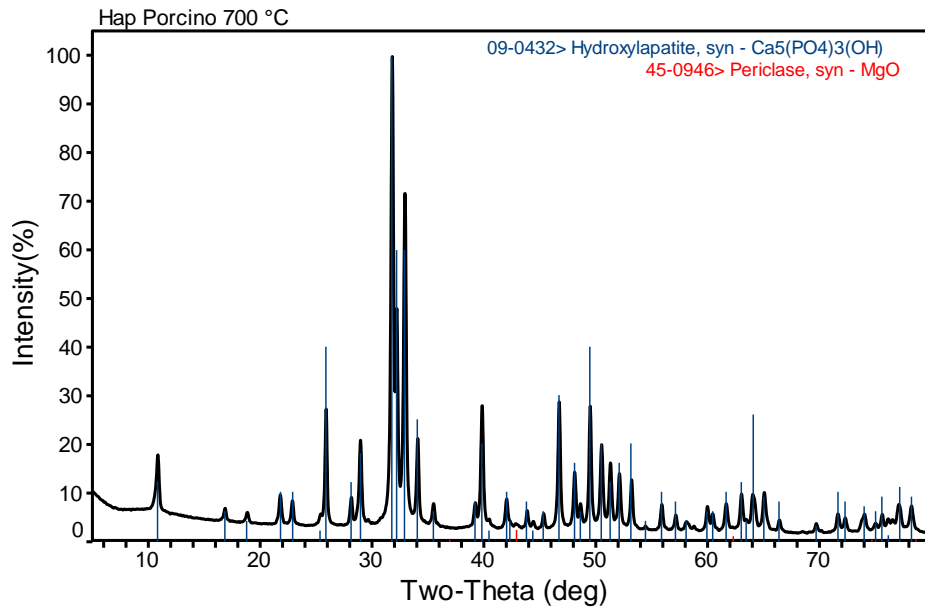


Figura 51 Difractograma de bio-Hap a 700 °C por 3 horas a 5 °C/min

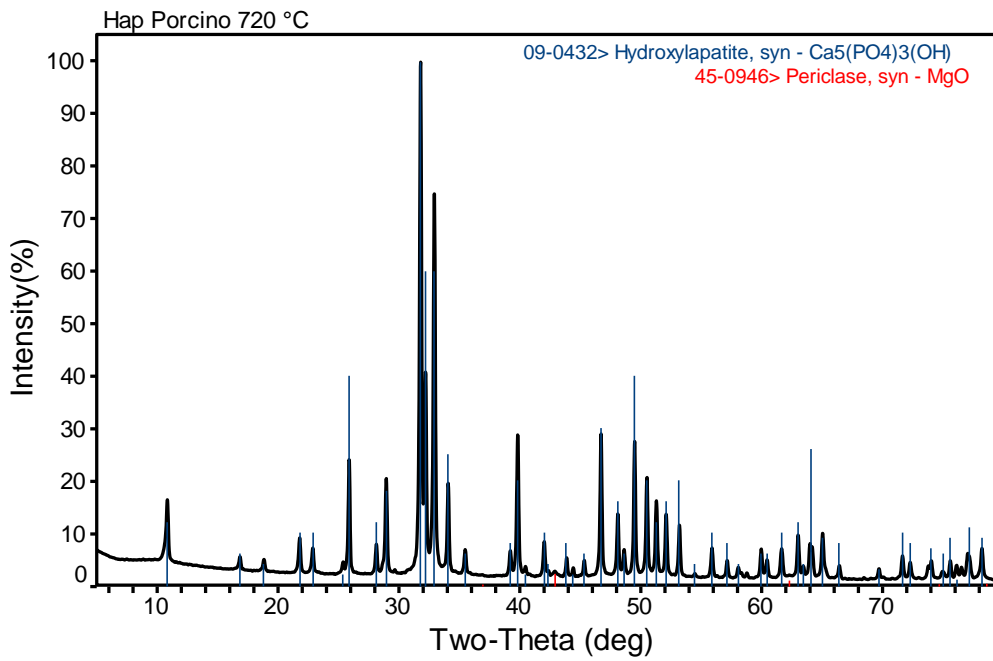


Figura 52 Difractograma de bio-Hap a 720 °C por 3 horas a 5 °C/min

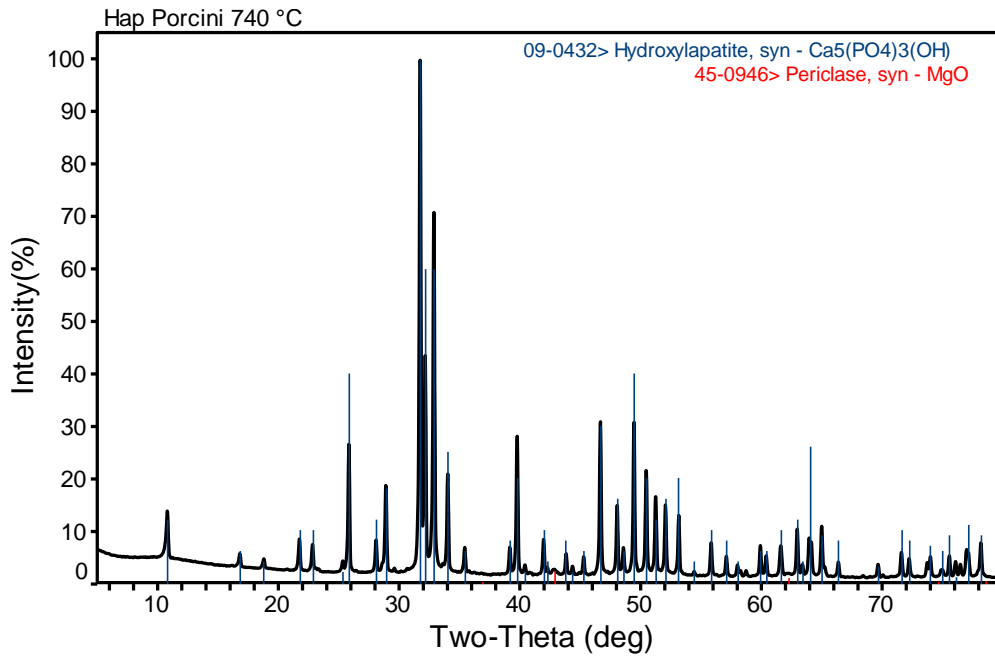


Figura 53 Difractograma de bio-Hap a 740 °C por 3 horas a 5 °C/min

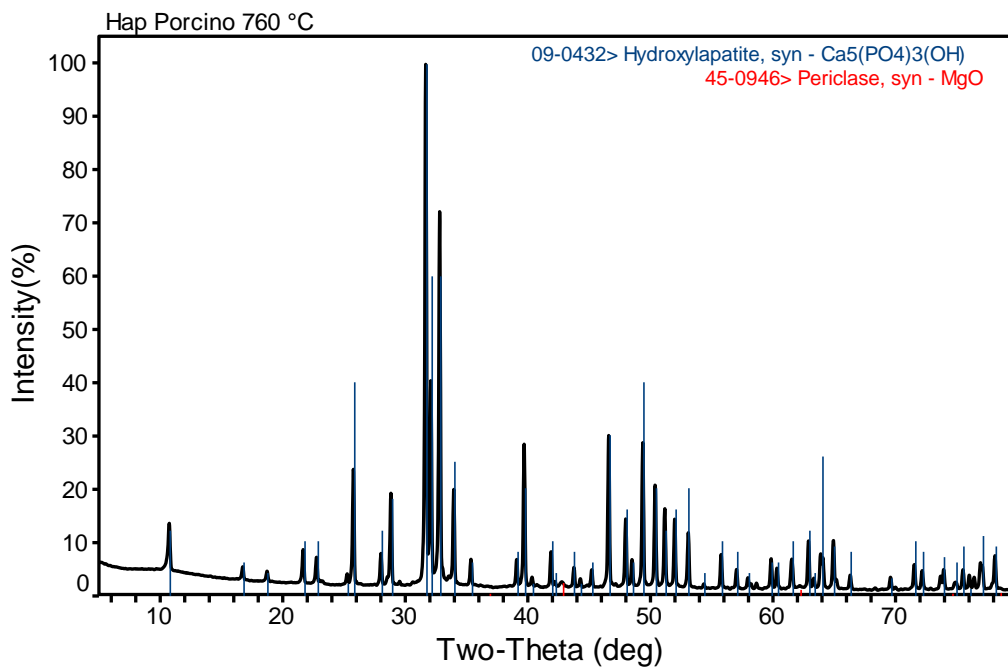


Figura 54 Difractograma de bio-Hap a 760 °C por 3 horas a 5 °C/min

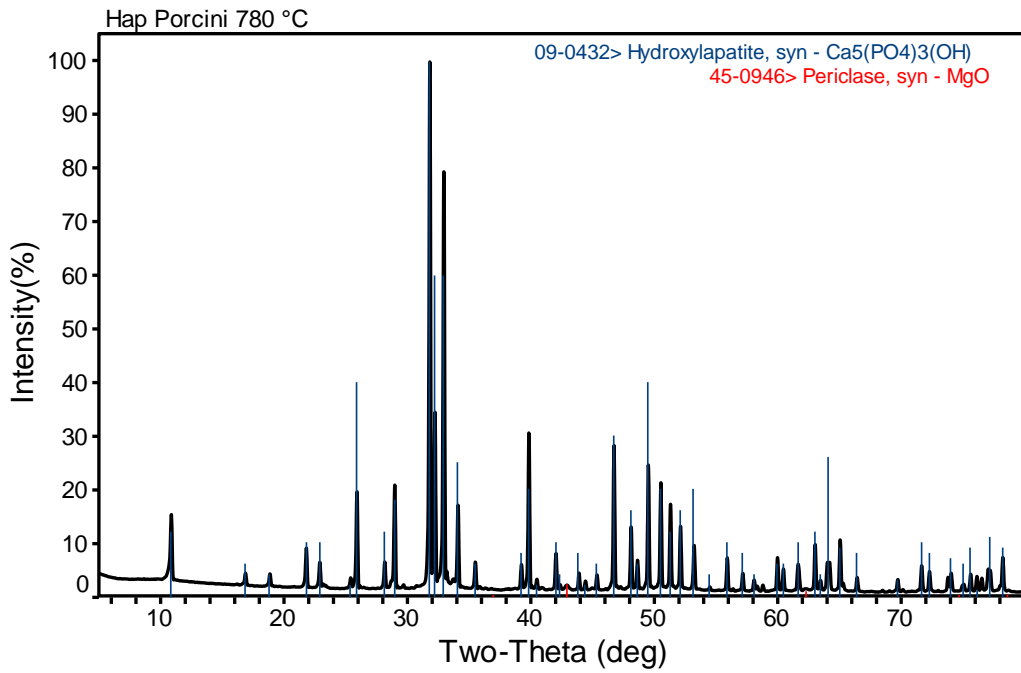


Figura 55 Difractograma de bio-Hap a 780 °C por 3 horas a 5 °C/min

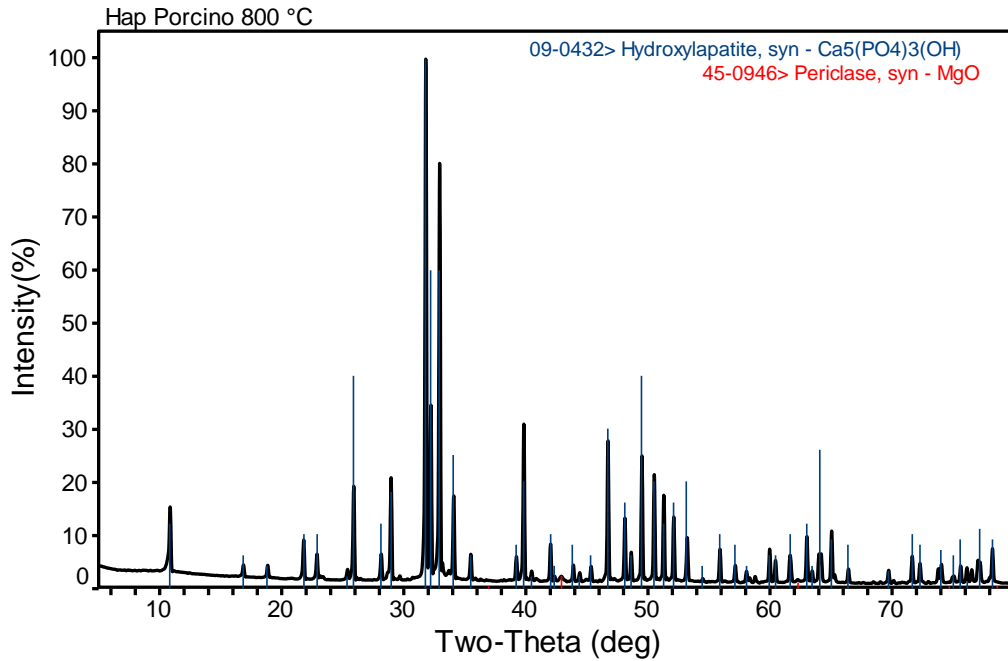


Figura 56 Difractograma de bio-Hap a 800 °C por 3 horas a 5 °C/min

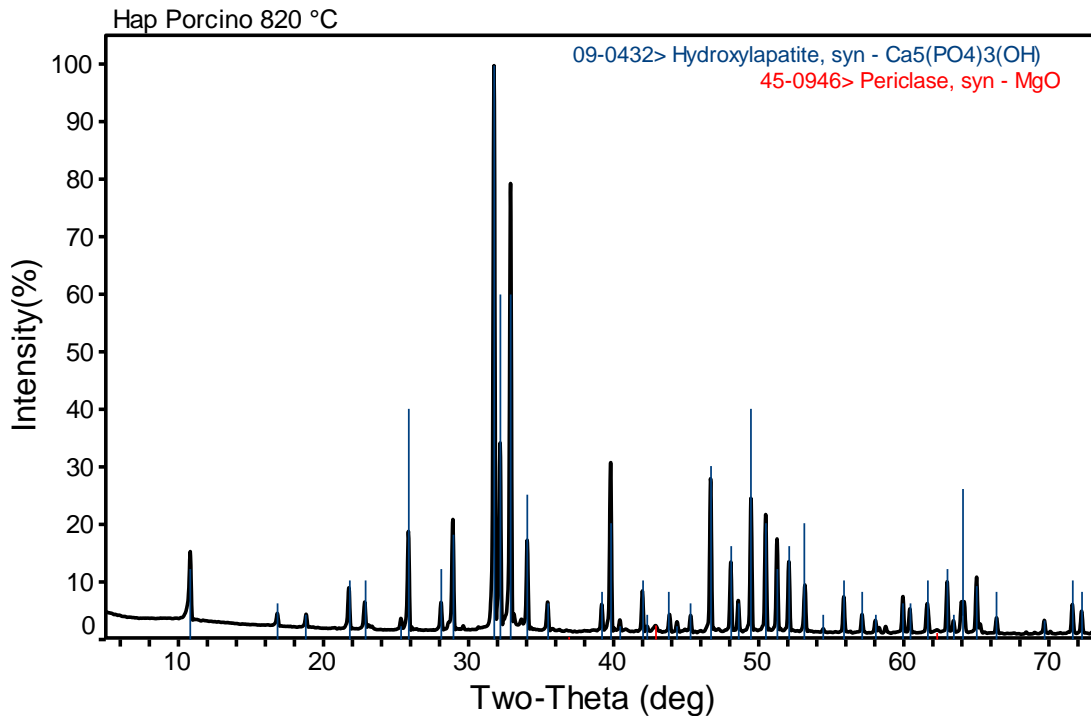


Figura 57 Difractograma de bio-Hap a 820 °C por 3 horas a 5 °C/min